

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Markéta Jirátová

**METABOLISMUS NOVÝCH POLYSACHARIDICKÝCH
NANOMATERIÁLŮ PRO BIOMEDICINÁLNÍ APLIKACE**

Metabolism of new polysaccharidic nanomaterials for biomedical
applications

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Martin Hrubý, PhD.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, _____

Podpis

Markéta Jirátová

Poděkování

Ráda bych poděkovala především oběma svým školitelům, Mgr. Martinu Hrubému, PhD. a RNDr. Janu Kováři, CSc., za projevený zájem a podporu při zpracování této diplomové práce. Dále MUDr. Janě Mattové za pomoc při i.v. aplikaci myším, Mgr. Ondřeji Lukšanovi za rady ohledně ovládání přístrojů, Ing. Miluši Vlachové a Mgr. Marii Heczkové za rady ohledně tkáňových kultur, Mgr. Kateřině Rybákové a Mgr. Kateřině Zemánkové za příjemnou atmosféru v naší kanceláři a optimistickou náladu, Danuši Körberové za ochotu kdykoliv pomoci a poradit, několika svým přátelům za upřímný zájem o moji diplomovou práci, přestože se jejich studium biologie vůbec netýká, v neposlední řadě pak své rodině za podporu nejen v průběhu mého studia a svému příteli za reálný pohled na věc a optimismus.

ABSTRAKT

Nádorová onemocnění jsou jednou z hlavních příčin úmrtí v současném světě, proto je zde snaha o vytvoření nových lepších diagnostických postupů a specifitější léčby s nižší toxicitou. Nanočástice nám poskytují mnoho vlastností, které mohou tyto cíle naplnit. Snadno se dostanou do tkáně pevných nádorů pomocí tzv. EPR efektu. Dále lze vytvořit nanočástice s možností kombinovat více zobrazovacích modalit na jedné nanočástici. Stejně tak některé nanočástice mohou kombinovat diagnostickou a terapeutickou složku, což představuje v současné době velmi populární téma theranostiky.

Cílem této práce byla charakteristika nových multimodálních glykogenových nanočástic. Glykogen představuje ideální molekulu pro vývoj nanočástic. Řadí se mezi přírodní dendrimery, které lze snadno modifikovat. Velikost glykogenu je také velmi vhodná pro cílení EPR efektem.

Popsali jsme biologické vlastnosti pěti různých typů značeného glykogenu. In vitro experimenty jsme prováděli na buněčné linii HepG2. Určili jsme průběh buněčného vychytávání a cytoplazmatickou lokalizaci značeného glykogenu. Jako první jsme provedli test cytotoxicity pomocí MTT u těchto značených glykogenů. Biodistribuční studie u CD1-Nude myši jsme provedli pomocí neinvazivní metody měření in vivo fluorescence.

Závěrem lze říci, že jsme určili některé z biologických vlastností nových glykogenových nanočástic a nastínili jsme některé nové otázky a výzvy pro jejich budoucí vývoj.

Klíčová slova: glykogen, nanočástice, drug delivery, EPR, fluorescence, HepG2, CD1-Nude, nádorová diagnostika

ABSTRACT

Cancer is one of the leading cause of death in modern world, so there is an emerging demand for better diagnostic tools and more specific less toxique therapeutics. Nanoparticles offers characteristics that could fullfill such perspectives. They can easily target tumor by ehanced permeation and retention effect (EPR). Nanoparticles can combine more than one imaging properties, so we can say that they are multimodal, some of them could combine diagnostic and therapeutic molecules in one nanoparticle, which is now highly popular topic of nanoparticles for theranostics .

The aim of this thesis was to characterize new multimodal glycogen-based nanoparticle. Glycogen is an ideal structure for nanoparticle design. Glycogen is part of natural dendrimers group which are easily to modify. Glycogen's size is suitable for EPR effect.

We have evaluated biological characteristics of five different types of modified glycogen. The in vitro experiments were carried on HepG2 cells. We have set time curve of cellular uptake of this glycogen probes, evaluated cytoplasmatic localization and for the first time we have carried MTT assay. Biodistribution studies on CD1-Nude mice were performed by using non-invasive method for measuring in vivo fluorescence.

In conclusion we've provided some of the biological characteristics of new glycogen-based nanoparticles and we've opened some of the new perspectives and challenges for their future design.

Key words: glycogen, nanoparticles, drug delivery, EPR, fluorescence, HepG2, CD1-Nude, cancer diagnostics

OBSAH

| | |
|--|----|
| SEZNAM ORÁZKŮ | 4 |
| SEZNAM ZKRATEK | 6 |
| 1. Úvod | 10 |
| 2. Literární přehled..... | 11 |
| 2.1. Glykogen..... | 11 |
| 2.1.1. Biosyntéza glykogenu..... | 12 |
| 2.1.1.1. UDP-glukózadifosforyláza | 12 |
| 2.1.1.2. Glykogensyntáza..... | 13 |
| 2.1.1.3. Glykogenin..... | 16 |
| 2.1.1.4. Amylotransglykosyláza - větvící enzym | 17 |
| 2.1.2. Degradace glykogenu | 18 |
| 2.1.2.1. Glykogenfosforyláza | 18 |
| 2.1.2.2. Linearizační enzym | 19 |
| 2.1.2.3. Fosfoglukomutáza | 20 |
| 2.2. Polymerní a nanočásticová diagnostika a terapeutika nádorových onemocnění..... | 22 |
| 2.2.1. Polymerní konjugáty..... | 23 |
| 2.2.1.1. Lineární polymery | 24 |
| 2.2.1.2. Micely a liposomy | 25 |
| 2.2.1.3. Dendrimery..... | 25 |
| 2.2.2. Nádorové cílení, cílená doprava a řízené uvolňování léčiv ("drug delivery")..... | 27 |
| 2.2.2.1. Pasivní akumulace EPR efektem | 27 |
| 2.2.2.2. Ligandové cílení | 28 |
| 2.2.2.3. Další druhy cílení..... | 29 |
| 2.2.3. Metody diagnostiky a zobrazování | 31 |
| 2.2.3.1. MRI..... | 31 |
| 2.2.3.2. In vivo fluorescence | 34 |
| 2.2.3.3. Multimodální zobrazování..... | 35 |
| 2.3. Glykogen jako polymerní nosič..... | 36 |

| | |
|--|----|
| 2.3.1. Degradace externě podaného glykogenu | 37 |
| 3. Cíle práce | 38 |
| 4. Materiály a metody | 39 |
| 4.1. Použité buněčné linie, zvířecí modely, chemikálie, materiál a přístroje..... | 39 |
| 4.1.1. Buněčná linie..... | 39 |
| 4.1.2. Zvířecí model..... | 39 |
| 4.1.3. Chemikálie | 39 |
| 4.1.4. Materiál | 40 |
| 4.1.5. Přístroje | 41 |
| 4.1.6. Statistické vyhodnocení..... | 43 |
| 4.2. Typy jednotlivých značených glykogenů..... | 43 |
| 4.3. Modelové buněčné linie a organismy | 44 |
| 4.3.1. HepG2..... | 44 |
| 4.3.2. CD1-Nude..... | 45 |
| 4.4. Tkáňové kultury | 45 |
| 4.5. Měření hodnot fluorescence média | 46 |
| 4.6. Měření hodnot fluorescence média před a po odmytí značeného glykogenu | 47 |
| 4.7. Konfokální mikroskopie | 48 |
| 4.8. Inhibice internalizace | 50 |
| 4.9. MTT test..... | 51 |
| 4.10. In vivo fluorescence | 53 |
| 5. Výsledky | 55 |
| 5.1. Průběh vychytávání značeného glykogenu z média HepG2 buněčnou linií | 55 |
| 5.2. Hodnocení intracelulární lokalizace pomocí konfokální mikroskopie | 60 |
| 5.3. Určení způsobu internalizace externě podaného glykogenu | 68 |
| 5.4. MTT test cytotoxicity..... | 70 |
| 5.5. In vivo lokalizace | 72 |
| 6. Diskuze | 81 |
| 6.1. Průběh vychytávání značeného glykogenu HepG2 buňkami | 81 |

| | |
|---|----|
| 6.1.1. Vliv modifikací značeného glykogenu..... | 82 |
| 6.2. Lokalizace značeného glykogenu v HepG2 buňkách | 82 |
| 6.3. Způsob internalizace značeného glykogenu | 85 |
| 6.4. Hodnocení cytotoxicity značeného glykogenu | 86 |
| 6.5. Biodistribuce a eliminace glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 <i>in vivo</i> u CD1-Nude myši..... | 87 |
| 7. Závěr | 89 |
| 8. Seznam literatury..... | 90 |
| 9. Přílohy | 99 |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| OBRÁZEK 1: CHEMICKÁ STRUKTURA GLYKOGENU | 11 |
| OBRÁZEK 2: SCHÉMATICKÁ REPREZENTACE EFEKTU GLUKÓZA-6-FOSFÁTU NA ALOSTERICKOU STIMULACI A KOVALENTNÍ ZMĚNU STAVU GLYKOGEN SYNTÁZY..... | 14 |
| OBRÁZEK 3: SCHÉMA POLYMERNÍHO KONJUGÁTU PRO "DRUG-DELIVERY". UPRAVENO DLE LARSON A GHANDEHARI..... | 23 |
| OBRÁZEK 4: SCHÉMA PRINCIPU MRI. | 32 |
| OBRÁZEK 5: PROPUSTNOST SVĚTLA VRSTVAMI KŮŽE V ZÁVISLOSTI NA VLNOVÉ DÉLCE. | 34 |
| OBRÁZEK 6: ČASOVÝ PRŮBĚH VYCHYTÁVÁNÍ GLYKOGEN-DOTA Gd-DYOMICS 615 Z MÉDIA BUNĚČNOU LINIÍ HEPG2..... | 55 |
| OBRÁZEK 7: ČASOVÝ PRŮBĚH VYCHYTÁVÁNÍ GLYKOGEN- <i>GRAFT</i> -POLY(2-METHYL- 2-OXAZOLINU) Z MÉDIA BUNĚČNOU LINIÍ HEPG2..... | 56 |
| OBRÁZEK 8: ČASOVÝ PRŮBĚH VYCHYTÁVÁNÍ GLYKOGEN- <i>GRAFT</i> -POLY(2-METHYL- 2-OXAZOLINU) Z MÉDIA BUNĚČNOU LINIÍ HEPG2. KŘIVKA PRO PRVNÍCH 8 HODIN PRO LEPŠÍ ILUSTRACI ROZDÍLŮ MEZI DVĚMA VARIANTAMI GLYKOGEN- <i>GRAFT</i> -POLY(2-METHYL-2-OXAZOLIN)..... | 57 |
| OBRÁZEK 9: POKLES RELATIVNÍCH HODNOT FLUORESCENCE MÉDIA S GLYKOGEN- <i>GRAFT</i> -POLY(2-METHYL-2OXAZOLIN) PRO PRVNÍCH 480 MINUT MĚŘENÍ..... | 58 |
| OBRÁZEK 10: ČASOVÝ PRŮBĚH ZMĚN HODNOT FLUORESCENCE MÉDIA PO PŘIDÁNÍ MÉDIA SE ZNAČENÝM GG K HEPG2 BUŇKÁM A NÁSLEDNÉ VÝMĚNĚ ZA ČISTÉ MÉDIUM VE 360 MINUTĚ..... | 59 |
| OBRÁZEK 11: GLYKOGEN- <i>GRAFT</i> -POLY(2-METHYL-2-OXAZOLIN) S NIŽŠÍM OBSAHEM POLYOXAZOLINU V HEPG2 BUŇKÁCH. | 60 |
| OBRÁZEK 12: GLYKOGEN-DOTA Gd-DYOMICS 615 V BUNĚČNÉ LINII HEPG2. . | 61 |
| OBRÁZEK 13: GLYKOGEN-DOTA Gd-DYOMICS 615 (ČERVENÝ FLUORESCENČNÍ SIGNÁL) SPOLU S HOECHST 33342 (MODRÝ FLUORESCENČNÍ SIGNÁL) U BUNĚČNÉ LINIE HEPG2..... | 61 |
| OBRÁZEK 14: HEPG2 BUŇKY FLUORESCENČNĚ ZNAČENÉ GLYKOGEN-DOTA Gd- DYOMICS 615 A ER-TRACKER™BLUE-WHITE DPX. | 62 |
| OBRÁZEK 15: HEPG2 BUŇKY FLUORESCENČNĚ ZNAČENÉ GLYKOGEN-DOTA Gd- DYOMICS 615 A ER-TRACKER™BLUE-WHITE DPX. | 63 |
| OBRÁZEK 16: HEPG2 BUŇKY FLUORESCENČNĚ ZNAČENÉ GLYKOGEN-DOTA Gd- DYOMICS 615 A ER-TRACKER™BLUE-WHITE DPX. | 64 |
| OBRÁZEK 17: HEPG2 BUŇKY BARVENÉ LYSOTRACKER® DEEP RED A GLYKOGEN- POX-FITC..... | 65 |
| OBRÁZEK 18: HEPG2 BUŇKY BARVENÉ LYSOTRACKER® DEEP RED A GLYKOGEN- POX-FITC..... | 66 |
| OBRÁZEK 19: HEPG2 BUŇKY BARVENÉ LYSOTRACKER® DEEP RED A GLYKOGEN- FITC..... | 66 |

| | |
|--|-----|
| OBRÁZEK 20: HEPG2 BUŇKY BARVENÉ LYSOTRACKER® DEEP RED A GLYKOGEN-FITC..... | 67 |
| OBRÁZEK 21: HEPG2 BUŇKY BARVENÉ LYSOTRACKER® DEEP RED A GLYKOGEN-FITC..... | 67 |
| OBRÁZEK 22: ČASOVÝ PRŮBĚH VYCHYTÁVÁNÍ GLYKOGENU-DOTA Gd-DYOMICS 615 PO PŘIDÁNÍ INHIBITORŮ..... | 68 |
| OBRÁZEK 23: ČASOVÝ PRŮBĚH VYCHYTÁVÁNÍ GLYKOGENU-GRAFT-POLY(2-METHYL-2-OXAZOLIN) PO PŘIDÁNÍ INHIBITORŮ..... | 69 |
| OBRÁZEK 24: 96-JAMKOVÁ DESTIČKA S VÝSLEDKY TESTU CYTOTOXICITY POMOCÍ MTT. | 70 |
| OBRÁZEK 25: VÝSLEDKY TESTU CYTOTOXICITY POMOCÍ MTT PRO GLYKOGEN-FITC..... | 71 |
| OBRÁZEK 26: SÉRIE SEDMI OBRÁZKŮ BIODISTRIBUCE GLYKOGEN-DOTA Gd-DYOMICS 615. | 73 |
| OBRÁZEK 27: SROVNÁNÍ <i>IN VIVO</i> FLUORESCENCE PŘED A PO APLIKACI GLYKOGEN-DOTA Gd-DYOMICS 615..... | 74 |
| OBRÁZEK 28: PRVNÍ MYŠ 3 MINUTY PO I.V.APLIKACI GLYKOGEN-DOTA Gd-DYOMICS 615 DO OCASNÍ ŽÍLY. | 75 |
| OBRÁZEK 29: SÉRIE 20 SNÍMKŮ V ČASOVÝCH INTERVALECH JEDNÉ MINUTY PRVNÍ MYŠI PO I.V. APLIKACI GLYKOGEN DOTA Gd- DYOMICS 615..... | 76 |
| OBRÁZEK 30: TŘI POLOHY ZOBRAZENÍ PRO BIODISTRIBUCI GLYKOGEN-DOTA Gd-DYOMICS 615 | 77 |
| OBRÁZEK 31: ODHALENÉ VNITŘNÍ ORGÁNY PRVNÍ POKUSNÉ MYŠ PO UKONČENÍ SÉRIE SNÍMKŮ. | 78 |
| OBRÁZEK 32: FLUORESCENCE VNITŘNÍCH ORGÁNŮ (STŘEVA, JÁTRA, LEDVINY, MOČOVÝ MĚCHÝŘ, SLEZINA). | 79 |
| OBRÁZEK 33: FLUORESCENČNÍ SIGNÁL MOČI OD PRVNÍ POKUSNÉ MYŠI. | 79 |
| OBRÁZEK 34: JINAK NASTAVENÁ FLUORESCENČNÍ ŠKÁLA PRO OBR. 31..... | 80 |
| OBRÁZEK 35: JINAK NASTAVENÉ FLUORESCENČNÍ ŠKÁLA PRO OBR. 32..... | 80 |
| OBRÁZEK 36: 4T1 BUŇKY ZNAČENÉ GLYKOGEN-DOTA Gd-DYOMICS 615 SPOLU S HOECHST 33342 | 84 |
| OBRÁZEK 37: PRŮBĚH VYLUČOVÁNÍ GLYKOGEN-DOTA Gd-DYOMICS 615 <i>IN VIVO</i> ZOBRAZENÝ POMOCÍ MRI U MYŠI KMENE C57/B16 | 888 |

SEZNAM ZKRATEK

| | | |
|-------|---|--|
| ABC | ABC přenašeče | ATP-binding cassette transporters |
| ACE | angiotenzin- konvertující enzym | angiotenzin converting enzyme |
| AGL | gen pro GDE | GDE's gene |
| AMP | adenosinmonofosfát | adenosin monophosphate |
| ATP | adenosintrifosfát | adenosin triphosphate |
| AUC | plocha pod křivkou | area under the concentration-time curve |
| cDNA | komplementární DNA | complementary DNA |
| CMC | kritická micelární koncetrace | critical micelle concentration |
| CT | výpočetní tomografie | computed tomography |
| Cy5 | cyanin 5 | cyanine 5 |
| Cy5.5 | cyanin 5.5 | cyanine 5.5 |
| DNA | kyselina deoxyribonuleová | deoxyribonucleic acid |
| DOTA | 1,4,7,10- tetraazacyklododeka n-1,4,7,10- tetraoctová kyselina | 1,4,7,10- tetraazacyclododeca ne-1,4,7,10- tetraacetic acid |
| EGFR | receptor pro endotelový růstový faktor | epidermall growth factor receptor |

| | | |
|-------|--|--|
| EPR | efekt zvýšené propustnosti a zadržování | enhanced permeation and retention effect |
| ErbB2 | erytroblastový onkogen B2 | erythroblastosis oncogen B2 |
| GP | glykogenfosforyláza | glycogen phosphorylase |
| GPa | glykogenfosforyláza a | glycogen phosphorylase a |
| GPb | glykogenfosforyláza b | glycogen phosphorylase b |
| GSD | porucha v ukládání glykogenu | glycogen storage disease |
| HER1 | receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2 | human epidermal growth factor receptor 2 |
| FITC | fluorescein | fluorescein |
| fMRI | funkční magnetická rezonance | functional magnetic resonance imaging |
| FR | receptor pro kyselinu listovou | folate receptor |
| G6P | glukóza-6-fosfát | glucose-6-phosphate |
| GDE | linearizační enzym | glycogen debranching enzyme |
| GG | glykogen | glycogen |
| HER2 | receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2 | human epidermal growth factor receptor 2 |
| HMGS | lidská svalová glykogensyntáza | human muscle glycogen synthase |

| | | |
|-------|--|--|
| HPMA | N-(2-hydroxypropyl) metakrylamid | N-(2- hydroxypropyl)metac rylamid |
| hUGP | lidská uridin difosfo- glukóza difosforiláza | human uridin diphospho-glucose pyrophosphorylase |
| LGS | jaterní glykogensyntáza | liver glycogen synthase |
| MBCD | methyl-β- cyklodextrin | methyl-β- cyklodextrin |
| MGS | svalová glykogensyntáza | muscle glycogen synthase |
| MDR | léková rezistence | multidrug resistance |
| MRI | magetická rezonance | magnetic resonance imaging |
| mRNA | mediátorová RNA | messenger RNA |
| MTT | 3-(4,5-dimethyl-2- thiazolyl)-2,5- difenyl-2H- tetrazolium bromid | 3-(4,5-dimethyl-2- thiazolyl)-2,5- diphenyl-2H- tetrazolium bromide |
| NIR | blízké infračervené spektrum | near infrared spectrum |
| NO | oxid dusnatý | nitric oxid |
| PAMAM | poly(amidoamine) | poly(amidoamine) |
| PDT | čas zdvojení populace | population doubling time |
| PEG | polyethylenoxid | polyethylenoxide |
| PET | pozitronová emisní tomografie | positron emission tomography |
| PGM | fosfoglukomutáza | phosphoglucomutase |

| | | |
|---------|---|--|
| PGM-CDG | PGM-kongenitální porucha glykosylace | PGM - congenital disorder of glycosylation |
| PGM-P | fosforylovaná PGM | phosphorylated PGM |
| POX | polyoxazolin | polyoxazoline |
| RES | retikuloendotelový systém | reticuloendothelial system |
| SGP | protein schopný své vlastní glykosylace | self-glucosylating protein |
| siRNA | malé interferující RNA | small interfering RNA |
| SMANCS | konjugát neokarzitatinu a s kopolymerem styrenu a maleinanhydridu | conjugate of neocarzinostatin and poly(styrene- comaleic) acid anhydride |
| SPECT | jednofotonová emisní výpočetní tomografie | single photon emission computed tomography |
| TAF | nádorový angiogenetický faktor | tumor-angiogenesis factor |
| UGP | uridin - glukózadifosforyláza | uridine diphosphate- glucose pyrophosphorylase |
| VEGF | vaskulární endoteliální růstový faktor | vascular endothelial growth factor |
| VEGFR | receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor | vascular endothelial growth factor receptor |

1. Úvod

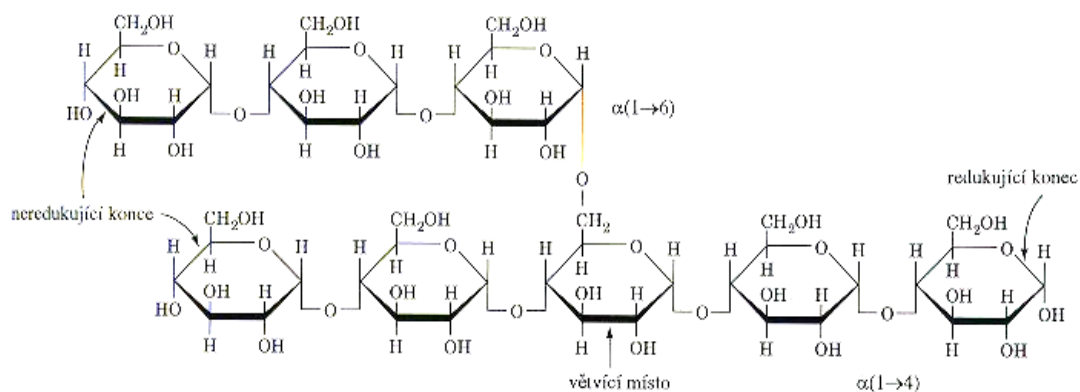
V oblasti výzkumu, který se zabývá nanomateriály, dochází v současné době k rychlému pokroku. Nanomateriály mají slibný potenciál pro využití v mnoha oborech dnešní medicíny, přičemž onkologie je jedním z nich. Onkologická onemocnění mají zvyšující se prevalenci v mnoha vyspělých státech světa, která souvisí s prodlužující se délkou dožití. I přes značný pokrok v posledních letech je léčba a diagnostika těchto onemocnění limitována řadou faktorů, mezi něž patří finanční nákladnost léčby, malá specifita k nádorové tkáni a z ní vyplývající závažné vedlejší účinky na tkáň zdravou. Systémy pro cílenou dopravu a řízené uvolňování léčiv (*drug delivery*) založené na některých vlastnostech nanomateriálů mají velký potenciál překonat alespoň některá tato omezení. Lze kombinovat více typů cílení spolu s léčivem na jedné molekule, potencionálně předcházet zasažení zdravé tkáně a zároveň zvýšit koncentraci léčiva v tkáni nádorové, která by jinak nebyla kvůli vedlejším účinkům efektivně zasažitelná. V neposlední řadě nanomedicína skrývá potenciál kombinace diagnostiky spolu s terapií (theranostika), což umožňuje sledování vývoje léčby nádoru v reálném čase a tedy i případnou úpravu dávek dle výsledků u konkrétního pacienta (personalizovaná medicína).

Glykogen svojí velikostí spadá do oblasti nanomateriálů, navíc je tělu vlastním přírodním polysacharidem, který se štěpí snadno intracelulárně, nicméně v krevním řečišti, kde se normálně nevyskytuje, takřka není štěpen. Jeho struktura pak umožňuje četné a snadné modifikace - vazbu léčiv, kontrastních látek, ligandů aj. Mohl by tedy být efektivním biokompatibilním biodegradovatelným a relativně levným nosičem pro nádorovou diagnostiku, i případnou terapii.

2. Literární přehled

2.1. Glykogen

Glykogen (GG) je zásobním polysacharidem živočichů. Jedná se o hypervětvený polymer D-glukózy (chemická struktura glykogenu Obr. 1).



Obrázek 1: Chemická struktura glykogenu (Voet and Voetová 1995).

První zmínky o GG pocházejí od francouzského fyziologa Clauda Bernarda. Ve dvou článcích (první z roku 1855, navazující článek pak vyšel roku 1857) popisuje "la matière glycogène" (v překladu bychom mohli říci "glykogenový materiál") a jeho tvorbu a funkci v játrech (Bernard 1855, 1857).

GG slouží jako zásobní zdroj glukózy. Vazba glukózových zbytků je v pozici α -(1→4) a větvení v pozici α -(1→6), větvení glykogenu připadá na každých 8-12 glukózových zbytků. Toto větvení má fyziologický význam, zajišťuje rychlou degradabilitu GG odštěpováním glukózových zbytků z konců GG a tudíž mobilizaci energie (Voet and Voetová 1995). Nejvíce glykogenu se v případě člověka nachází ve svalech a játrech. U osob vážících 70 kg je to v průměru 70 g v játrech a 400 g ve svalech. Ve svalech koncentrace více fluktuuje, protože svalový glykogen slouží jako rychlý lokální zdroj glukózy. Glukóza ze svalu nemůže být uvolněna do krevního řečiště, protože svalu chybí enzym glukóza-6-fosfatáza, která katalyzuje hydrolýzu Glc-6-P ($\text{Glc-6-P} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{glukóza} + \text{P}_i$) (Tirone and Brunicardi 2001). Tento enzym nechybí játrům, pro která není glukóza hlavním

zdrojem energie. Játra se pomocí tohoto enzymu podílí na udržování hladiny glukózy v krvi (Voet and Voetová 1995).

Ve svalech je GG formován do β částic, které dosahují velikosti 10 - 30 nm. V játrech má GG ještě jeden stupeň organizace, kdy β částice agregují v α částice či rozety, které dosahují velikosti až 300 nm. α částice GG v játrech jsou tvořeny s největší pravděpodobností kovalentní vazbou β částic GG, což bylo prokázáno na základě pokusů se zvyšující se koncentrací bromidu lithného, který narušuje vodíkové vazby a elektrostatické interakce (Sullivan et al. 2010).

2.1.1. Biosyntéza glykogenu

GG je biosyntetizován v několika následných krocích. Jeho biosyntéza i biodegradace je přísně regulována. Limitním krokem syntézy glykogenu je primer glykogenin. Syntézy se účastní tři hlavní enzymy - UDP-glukózadifosforyláza, glykogensyntáza a amylotransglykosyláza.

2.1.1.1. UDP-glukózadifosforyláza

UDP-glukózadifosforyláza (UGP, *uridine diphosphate-glucose pyrophosphorylase*) je důležitým enzymem, který má roli v produkci polysacharidů. Vyskytuje se ve všech eukaryotických buňkách. Katalyzuje vznik UDP-glukózy a pyrofosfátu z UTP a Glc-1-P (glukóza-1-fosfát) (Kleczkowski et al. 2004). Následně je UDP-glukóza glykogensyntázou přenášena na neredukující konec rostoucího glykogenového řetězce (Voet and Voetová 1995).

Lidská UGP (hUGP, *humanuridine diphosphate-glucose pyrophosphorylase*) je, na rozdíl od jiných druhů UGP, například rostlinných, aktivní ve formě oktameru, nicméně pouze sama o sobě tato oktamerová formace není dostatečná k aktivitě enzymu (Fuhning et al. 2013). Za tuto oligomerizaci zodpovídá C-terminální doména proteinu (Meng et al. 2009). Analýza cDNA dvou izoform svalové hUGP a jaterní hUGP poskytla informace o nukleotidové sekvenci, kde se dvě izoformy svalové hUGP lišily

pouze v 5'oblasti, respektive izoforma I byla o 11 nukleotidů kratší a zřejmě tedy využívá jiný iniciační kodón než svalová hUGP II. Jaterní hUGP pak vykazovala od svalových hUGP více odlišností v nukleotidové sekvenci. Označení "svalová hUGP" a "jaterní hUGP" se nicméně vztahuje pouze ke knihovně cDNA, ze které je autoři článku izolovali (Duggleby et al. 1996).

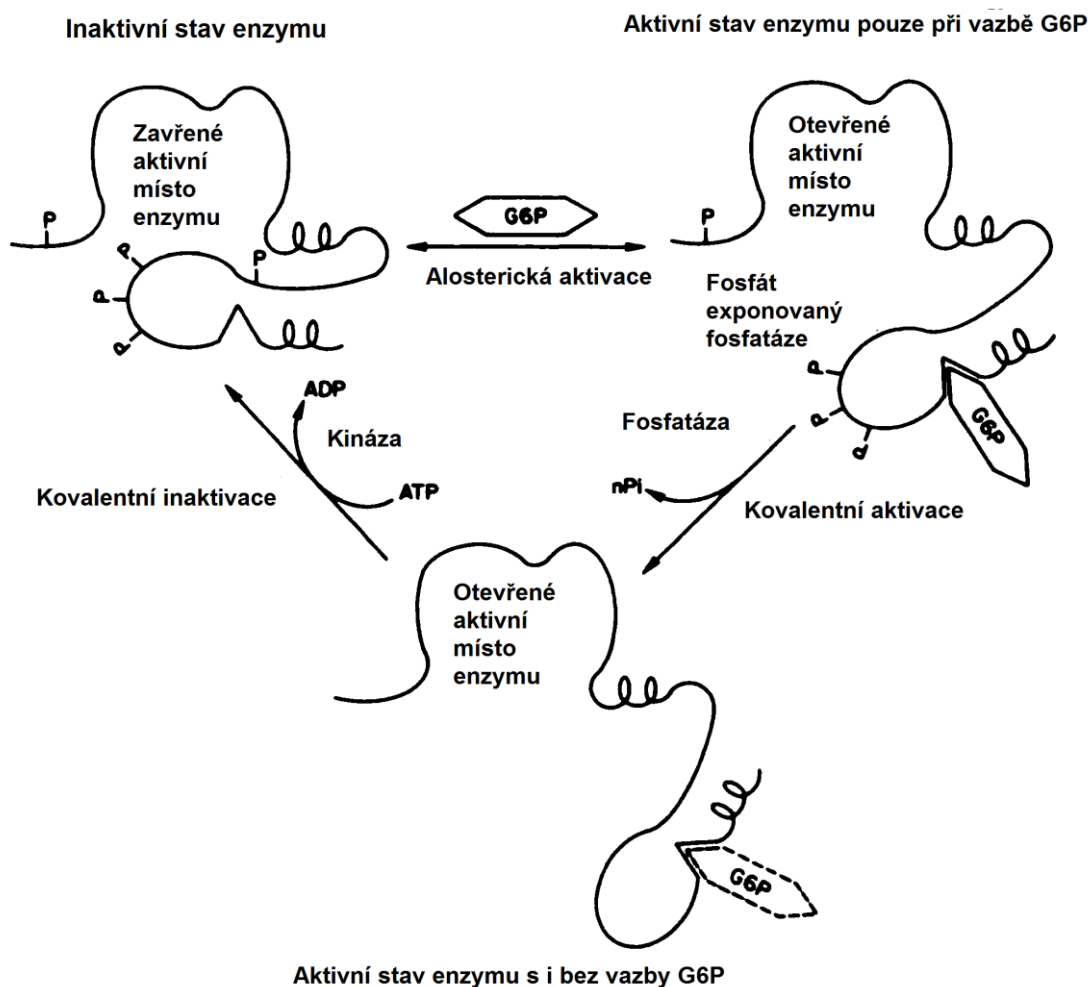
2.1.1.2. Glykogensyntáza

Glykogensyntáza je enzym katalyzující přenos UDP-glukózy na neredukující konec glykogenu, kde se váže glykosidovou vazbou α -(1 \rightarrow 4) (Voet and Voetová 1995). U savců se vyskytuje ve dvou izoformách, a to jako svalová glykogen syntáza (MGS, *muscle glycogen synthase*) se širokou tkáňovou distribucí, a jaterní glykogensyntáza (LGS, *liver glycogen synthase*) s expresí omezenou na jaterní tkáň (tkáňově specifická glykogensyntáza) (Roach et al. 1998).

Tyto dvě izoformy jsou u lidí homologní pouze asi ze 70 %, přičemž je menší homologie u C- a N- konce. Mezidruhová homologie (potkan - člověk) je vyšší (Nuttall et al. 1994). Stejně tak celková homologie potkaní LGS a lidské MGS vykazuje 70 % shodu, nicméně opět je nejkonzervovanější vnitřní úsek aminokyselinové sekvence (shoda 80 %). Nejmenší homologii vykazuje karboxylový konec (46 %), který je také zkrácen oproti lidské MGS (Bai et al. 1990).

Aktivita glykogensyntázy je ovlivněna fosforylací, která ji snižuje, a také alosterickým aktivátorem - glukóza-6-fosfátem (G6P).

Na rozdíl od svalové tkáně je koncentrace glukózy v krvi hlavním stimulem pro syntézu glykogenu v játrech, ve svalech je vliv této koncentrace menší (inzulín senzitivní tkáň). Nicméně zvýšená koncentrace glukóza-6-fosfátu aktivuje glykogensyntázu jak v játrech, tak i ve svalové a tukové tkáni. G6P také činí glykogensyntázu náchylnější k defosforylaci. Schéma alosterického účinku G6P na glykogensyntázu je znázorněno na Obr. 2 (Villar-Palasi and Guinovart 1997).



Obrázek 2: Schématická reprezentace efektu glukóza-6-fosfátu na alosterickou stimulaci a kovalentní změnu stavu glykogen syntázy. Upraveno dle (Villar-Palasi and Guinovart 1997).

Zásadním místem určujícím senzitivitu ke G6P se zdá být aminokyselinová oblast Arg-578 - Arg-590 , kdy při změně Arg na Ala se glykogensyntáza stává insenzitivní vůči G6P (Hanashiro and Roach 2002). Mutace v této oblasti také ovlivňuje syntézu glykogenu (von Wilamowitz-Moellendorff et al. 2013). Další důležitou oblastí je u HMGS (*human muscle glycogen synthase*) motiv E-X₇-E, kde Glu-510 je více konzervován mezi rodinami glykogensyntáz a také má větší vliv na aktivitu než Glu-518. Při mutaci Glu-510 nebo Glu-518 na Ala zůstala u glykogensyntázy zachována schopnost translokace k periférii v odpověď

na glukózu i schopnost vazby na glykogen, nicméně aktivita enzymu byla snížena až k hodnotám kontrolních buněk. V případě mutace na Glu-518 byla malá část aktivity zachována, tudíž má zřejmě pouze sekundární roli v ovlivnění aktivního místa enzymu (Cid et al. 2000).

Zajímavá je i výše naznačená schopnost translokace glykogensyntázy, která se u jednotlivých izoform liší. Při inkubaci izolovaných potkaních hepatocytů s glukózou se LGS translokuje z cytosolu k membráně buňky (Fernandez-Novell et al. 1997). Tato translokace je reverzibilní pokud následně inkubujeme hepatocyty v médiu bez glukózy (Garcia-Rocha et al. 2001). Naproti tomu MGS se za přítomnosti glukózy přemísťuje z jádra do cytosolu (Ferrer et al. 1997). Pozice LGS u membrány při zvýšené hladině glukózy souvisí také s tím, že se GG syntetizuje směrem od periferie do centra buňky (nově syntetizovaný glykogen posouvá dříve nasyntetizovaný) (Fernandez-Novell et al. 2002). Nejen syntéza GG má řízený charakter, stejně tak i degradace probíhá dle určitého řádu, kde se jako první odštěpují glukózové jednotky, které byly přidány jako poslední (Devos and Hers 1979).

Glykogensyntáza obsahuje několik fosforylačních míst (Ser⁷, Ser¹⁰, Ser⁶⁴⁰, Ser⁶⁴⁴, Ser⁶⁴⁸, Ser⁶⁵², Ser⁶⁵⁶). V případě LGS se zdá být zásadní fosforylační místo 2 (Ser⁷), které se nachází blízko NH₂ konce. V případě jeho mutace ze Ser na Ala (tudíž dochází k trvalé defosforylaci tohoto místa) je enzym aktivní a translokovaný k membráně buňky i bez přítomnosti glukózy v médiu. Fosforylační místa na COOH konci mají u LGS mnohem menší vliv než u MGS. LGS a MGS se také liší tím, že G6P je schopen dále zvýšit aktivitu u již aktivované (plně defosforylované) LGS více než u MGS (Ros et al. 2009).

2.1.1.3. Glykogenin

Glykogensyntáza může navazovat glukózový zbytek pouze na již preexistující α -(1→4)-vázaný glukanový řetězec a nikoliv na samostatný glukózový zbytek (Voet and Voetová 1995). Iniciální kroky v syntéze glykogenu tudíž nejsou zprostředkovány glykogensyntázou, nýbrž glykogeninem, který funguje jako primer pro syntézu glykogenu (Smythe and Cohen 1991).

Iniciátor syntézy glykogenu byl poprvé popsán jako α -(1→4) glukan vázaný na protein (Krisman and Barengo 1975). J.Lomako, W. M. Lomako a W. J. Whelan pak v roce 1988 tento, již lépe definovaný protein, označovaný jako SGP (*self-glucosylating protein*) pojmenovali glykogenin (Lomako et al. 1988). Glykogenin má glykosyltransferázovou aktivitu a zároveň funguje i jako akceptor pro glukózový zbytek. Jeho glykosylace, která představuje iniciální krok syntézyglykogenu, je tudíž autokatalytická. První glukózová jednotka je vázána na tyrosinový zbytek glykogeninu *O*-glykosidickou vazbou, pak jsou již glukózové zbytky navzájem vázány α -(1→4)-vazbou (Lomako et al. 1988, Pitcher et al. 1988).

Tento protein se vyskytuje ve dvou izoformách, které jsou kódovány dvěma odlišnými geny (Lomako et al. 2004). Gen pro lidský svalový glykogenin-1 byl pomocí *in situ* hybridizace lokalizován na chromozomu 3q25.1. Jedná se o 333 aminokyselin dlouhý protein (Barbetti et al. 1996). Glykogenin-2 byl poprvé charakterizován roku 1997 (Mu et al. 1997). Gen pro glykogenin-2 byl lokalizován na X chromozonu, v X-Y sdíleném regionu, jako konkrétní oblast byla určena p22.3 (Lomako et al. 2004). Gen pro glykogenin-2 se preferenčně vyskytuje v játrech, srdci a v menší míře také v pankreatu. Dle nynějších poznatků se nevyskytuje u hlodavců a nižších savců. Přestože je sekvenčně podobný genu pro glykogenin-1, proteiny se od sebe liší například v místě autoglykosylace (Tyr-228 pro glykogenin-2, Tyr-194 pro glykogenin-1) a také její rychlostí, která je pomalejší v případě glykogeninu-2. Glykogenin-2 existuje v několika izoformách, které jsou nejspíše důsledkem alternativního sestřihu (Mu et al. 1997).

Jaterní glykogenin-1 tvoří pouze 0,0025 % hmotnosti jater, což je v porovnání se svalovým glykogeninem-1 zhruba 200x méně, ve svalu je totiž glykogenin přítomen v každé β částici GG, přičemž v játrech, kde tyto částice agregují do větších α částic GG, tomu tak není (Smythe and Cohen 1991). V játrech může glykogenin-1 zastoupit také glykogenin-2 (Lomako et al. 2004). Jejich poměr je však závislý na nutričním stavu zvířete (Smythe et al. 1989). Svalový glykogenin-1 byl identifikován jako 38kDa podjednotka komplexu s glykogensyntázou (86 kDa), přičemž poměr 38 kDa a 86 kDa podjednotky byl 1:1. Tento poměr je tedy v játrech mnohem nižší (Pitcher et al. 1987), což se v poslední době vysvětluje zřejmě vyšším obsahem glykogeninu-2 v játrech (Mu et al. 1997).

Glykogenin využívá jako kofaktor pro svoji glykosyltransferázovou aktivitu Mn^{2+} (Mg^{2+}) ionty (Lomako et al. 2004, Smythe et al. 1989). Může se vyskytovat jako monomer i dimer, nicméně dimerizace není k vytvoření plně funkčního (glykosylovaného) primeru nezbytná (Issoglio et al. 2012).

Během první hodiny po podání glukózy se glykogenin k syntéze glykogenu nevyužívá, glukóza je navazována na reziduální jaterní glykogen. Až po 60 minutách je aktivován glykogenin, který během této doby připojil dostatek glukózových zbytků, tak aby se mohl stát substrátem pro glykogensyntázu a větvicí enzym (Ercan et al. 1994).

V syntéze glykogenu má svou roli také cytoskelet - aktinová vlákna asociují s glykogeninem. Glykogenin obsahuje na C konci sekvenci $^{321}DNIAKKL^{327}$, která je společným znakem mnoha aktin vázajících proteinů. Mutantní glykogenin Lys324Ala ztrácí schopnost vazby k aktinu a jeho cytoplasmatická lokalizace je změněna (Baque et al. 1997).

2.1.1.4. Amylotransglykosyláza - větvicí enzym

Tzv. větvicí enzym (EC 2.4.1.18) přidává ke glykogenu krátké řetězce glukózových zbytků pomocí α -(1 \rightarrow 6) glykosylové vazby (Voet and Voetová 1995). Je studován především v souvislosti s jeho disfunkcí, která způsobuje poruchu v ukládání glykogenu IV. typu (*glycogen storage disease type IV*, Andersonova choroba) (Lee et al. 2011). Porucha enzymu se projevuje

akumulací hůře rozpustného glykogenu (větvicí enzym zvyšuje rozpustnost glykogenových partikulí), vedoucí k mnoha komplikacím, vzhledem k fyziologické distribuci glykogenu především k cirhóze jater. Amylotransglykosyláza má tudíž podstatnou roli v metabolismu glykogenu, nicméně rychlost syntézy glykogenu jím ovlivněna není (Bollen et al. 1998).

Gen pro tento enzym byl pak metodou Southernovy hybridizace lokalizován na lidském chromozomu 3 (Thon et al. 1993).

2.1.2. Degradace glykogenu

2.1.2.1. Glykogenfosforyláza

Glykogenfosforyláza (GP) katalyzuje iniciální krok intracelulární degradace glykogenu, a to fosforolýzu glykogenu, kdy vzniká glykogen (n-1 zbytků) a glukóza-1-fosfát (Johnson 1992). GP může štěpit pouze glykosylové zbytky, které se nalézají pět a více jednotek od místa větvení glykogenu, což vyplývá ze struktury vazebného místa pro glykogen tohoto enzymu (Voet and Voetová 1995). Aktivita GP je regulována alosterickými interakcemi a také fosforylací, která je reverzibilní. Nefosforylovaná GP, tzv. GP_b, je v základním stavu neaktivní. Její aktivaci zajišťuje přítomnost AMP, inhibuje ji ATP a glukóza-6-fosfát, tedy ukazatele vysoko-energetického stavu buňky (Johnson and Barford 1990). Aktivita GP_b v přítomnosti AMP dosahuje asi 80 % plně aktivního stavu (GP_a) (Newgard et al. 1989). Fosforylací na Ser-14 vzniká GP_a, jejíž aktivita je na AMP nezávislá (Johnson and Barford 1990), i když přítomnost AMP může její aktivitu ještě mírně zvýšit (Johnson 1992). Mezi další inhibitory aktivity GP patří volná glukóza, která inhibuje GP_b i GP_a (Newgard et al. 1989).

N-terminální doména enzymu bývá také nazývána "regulační doména", protože se zde vyskytuje místo kovalentní modifikace, Ser-14, kde probíhá fosforylace GP. C-terminální doména se označuje jako "katalytická" (Newgard et al. 1989).

Enzym se v závislosti na alosterických a kovalentních regulacích může nacházet ve dvou konformačních stavech - R a T. R stav představuje

aktivní enzym, GP β v přítomnosti AMP nebo GP α . T konformace je pak neaktivním stavem enzymu (Johnson 1992).

Savčí GP se vyskytuje ve třech různých izoformách, které jsou v závislosti na jejich preferenční tkáňové expresi označovány jako jaterní GP, svalová GP a GP mozku. Ostatní tkáně exprimují různý poměr těchto izoenzymů, u lidí je nejvíce zastoupena jaterní GP. Tyto tři izoformy GP mají různé fyziologické role v organismu, na čemž závidí i jejich mírně odlišná regulace. Svalová GP zajišťuje rychlou mobilizaci zásob energie pro svalovou práci štěpením karbohydrátů. Jaterní GP reguluje hodnoty glukózy v krvi a poskytuje volné glukózové zbytky pro extrahepatickou tkáň. GP mozku má za úkol poskytovat energii ve formě glukózy při krátkých epizodách anoxie či hypoxie v mozku a předcházet tak jeho poškození (Newgard et al. 1989). Všechny tři typy GP se vyskytují jako homodimer a také jsou kódovány odlišnými geny (Bollen et al. 1998).

2.1.2.2. *Linearizační enzym*

Linearizační enzym, nebo-li GDE (*glycogen debranching enzyme*), katalyzuje degradaci glykogenu ve dvou krocích dvěmi odlišnými reakcemi. Má tedy dvě odlišné enzymatické funkce (Lucchiari et al. 2007). Jednak je to transferázová aktivita, kdy enzym působí jako α -(1 \rightarrow 4)-transglykosyláza (glykosyltransferáza) a potom také funguje jako α -(1 \rightarrow 6)-glukosidáza (Bollen et al. 1998). α -(1 \rightarrow 6)-glukosidáza provádí hydrolýzu vazby α -D-(1 \rightarrow 6), která spojuje glukózové zbytky u větvení glykogenu, za vzniku glukózy a glykogenu bez větvení v pozici α -(1 \rightarrow 6). α -(1 \rightarrow 4)-transglykosyláza přenáší α -(1 \rightarrow 4)-vázané trisacharidové jednotky z větví glykogenu na neredukující konec řetězce glykogenu, kde se vážou α -(1 \rightarrow 4) vazbou, tak aby bylo umožněno opětovné štěpení glykogenového řetězce fosforylázou (Voet and Voetová 1995). Obě tyto enzymatické funkce se nacházejí na jednom stejném polypeptidovém řetězci, což bylo prokázáno na základě akrylamidové gelové elektroforézy tohoto enzymu získaného ze svalové tkáně králíka (Taylor et al. 1975). Nejnovější výsledky ze začátku letošního roku předpokládají, že se obě enzymatické funkce vyskytují na N-terminální doméně. Dřívější

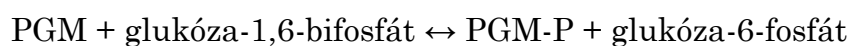
předpoklad byl, že s N-terminální doménou je asociována pouze aktivita glykosyltransferázová. Glukosidázová aktivita byla připisována C-terminální doméně (Min-Ho et al. 2014). Tento nový předpoklad však bude potřeba dále zpřesnit a potvrdit.

GDE je kódován jediným genem AGL o velikosti 85 kB, který byl poprvé zaklonován v roce 1992. Nachází se na chromosomu 1p21 (Lucchiari et al. 2007). Z tohoto genu pak může vzniknout šest různých izoform GDE, různých mRNA. Játra exprimují pouze izoformu 1, svaly pak izoformy 1 až 4 (Bollen et al. 1998). Izoformy 5 a 6 jsou pouze minoritní. Izoformy GDE se liší v 5' nepřekládané oblasti a předpokládá se i existence specifických promotorů pro různé izoformy (Bao et al. 1996). Deficience různých izoform enzymu pak souvisí s různými formami GSD typu III (Coriho choroba). U GSD IIIa chybí obě funkce enzymu, jak v játrech, tak i svalech. U GSD IIIb chybí obě enzymatické funkce pouze v játrech, v případě GSD IIIc je narušena pouze enzymatická funkce α -(1→6)-glukosidázy, GSD IIId postrádá jen glykosyltransferázovou aktivitu (Lucchiari et al. 2007).

Aktivita tohoto enzymu není také příliš závislá na regulačních mechanismech, které ovlivňují aktivitu fosforylázy (přítomnost ATP, glukóza-6-fosfátu, 5'-AMP aj.) (Taylor et al. 1975).

2.1.2.3. Fosfoglukomutáza

Fosfoglukomutáza (PGM, *phosphoglucomutase*) katalyzuje reverzibilní přenos fosfátové skupiny mezi pozicemi 1 a 6 u glukózy. Přeměna glukóza-1-P na glukóza-6-P, katalyzovaná PGM, probíhá ve dvou krocích a to:



PGM-P představuje fosforylovaný enzym (Ray and Roscelli 1964a, b). Fosfátová skupina se u PGM kovalentně váže k hydroxylové skupině serinového zbytku (Voet and Voetová 1995).

Glukóza-6-fosfát může mít následně tři rozdílné osudy. U svalů vstupuje do glykolýzy a poskytuje tak energii pro pracující sval. V játrech může být přeměněn na glukózu pomocí enzymu glukóza-6-fosfatázy, který se ve svalech nevyskytuje. Glukóza pak může přejít do krevního řečiště a vyrovnat svou hladinu v krvi. Glukóza-6-fosfát se také může stát součástí pentózo-fosfátové dráhy (Bollen et al. 1998, Morava 2014).

Porucha funkce tohoto enzymu vede jednak ke GSD14, narušenému metabolismu glykogenu, ale také ovlivňuje glykosylaci proteinů. Proto byla deficiencie PGM1 nedávno přehodnocena na kongenitální poruchu glykosylace (PGM-CDG, *congenital disorder of glycosylation*) (Morava 2014).

2.2. Polymerní a nanočásticová diagnostika a terapeutika nádorových onemocnění

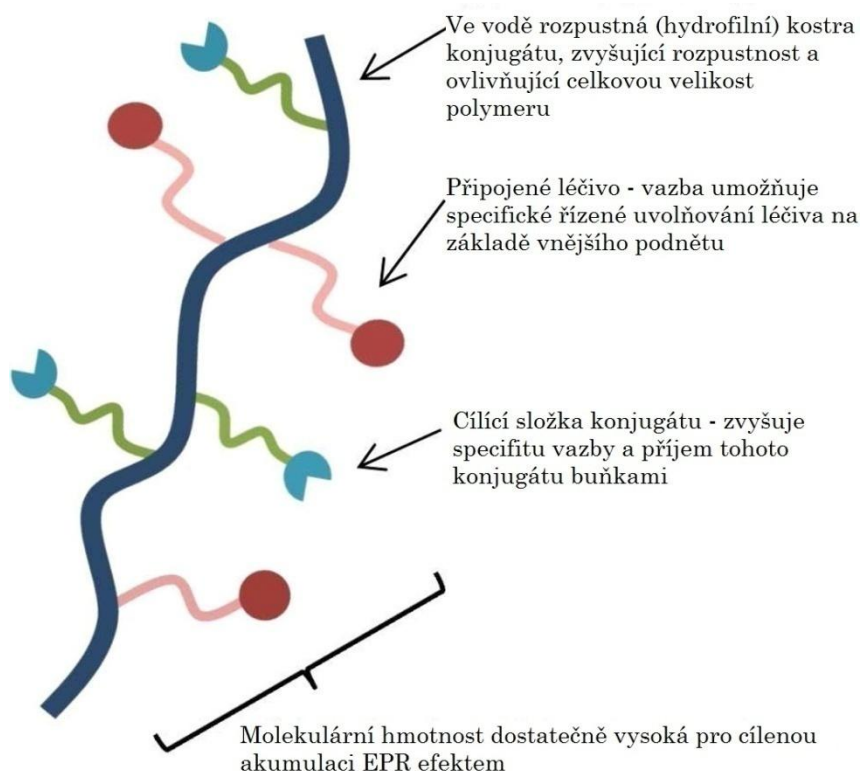
Většina současných léčiv spadá do kategorie nízkomolekulárních látek (relativní molekulová hmotnost maximálně 500). Polymerní či nanočásticová léčiva mají oproti nim několik výhod a z farmaceutického hlediska zajímavých vlastností, díky nimž je jim v poslední době věnována značná pozornost základního i aplikovaného výzkumu (Hrubý 2010). Velikost pohybující se mezi jednotkami až stovkami nanometrů je pak příčinou velkého povrchu nanočástic a některých specifických aspektů biologických vlastností (např. *Enhanced-Permeation Effect*, vizdále) (Hrubý 2012). Velmi důležitou vlastností nanočástic/polymerních systémů, zvláště z hlediska jejich aplikace v onkologii, je možnost kombinace léčiva a kontrastní látky pro různé zobrazovací metody na jedné takové částici. Tato kombinace se označuje pojmem *theranostika* (= terapie + diagnostika) a spadá do oblasti tzv. personalizované medicíny, kdy by se na základě výsledků léčby, které by bylo možné sledovat v reálném čase, upravoval její další průběh (Mura and Couvreur 2012).

Polymerní systémy pro "drug delivery" (řízené dopravování do nádorové tkáně) mohou být obecně rozděleny do tří kategorií na základě svého původu:

- a) přírodní polymery, které mají výhodu své obecně lepší biodegradability (oproti syntetickým polymerům), zvláště pak v případě, že je jejich degradace enzymaticky závislá,
- b) syntetické polymery, mezi jejichž přednosti patří jejich obecně nízká imunogenicita, širší možnosti chemických modifikací a často také lépe definovaná struktura oproti polymerům přírodním,
- c) hybridní polymery, které by v ideálním případě mohly kombinovat žádoucí vlastnosti obou předchozích skupin (Cho et al. 2008).

2.2.1. Polymerní konjugáty

Základní schéma polymerních konjugátů pro využití ve farmacii navržené roku 1975 Helmutem Ringsdorfem (Obr. 3) i dnes tvoří zjednodušený model struktury těchto látek (Larson and Ghandehari 2012).



Obrázek 3: Schéma polymerního konjugátu pro "drug-delivery".
Upraveno dle Larson a Ghandehari (Larson and Ghandehari 2012).

Ve srovnání s volným nízkomolekulárním léčivem má nízkomolekulární léčivo vázané na polymer vyšší maximální tolerovanou dávku. Polymerní nosič také snižuje výskyt vedlejších účinků navázaného léčiva (Kopecek 2013). Nanočástice s navázaným léčivem mají také potenciál obejít lékovou rezistenci (MDR, *multidrug resistance*), tedy vyhnout se efluxu pomocí ABC přenašečů (*ATP-binding cassette transporters*). Tato vlastnost byla prokázána například u lipidových nanočástic tvořených dimethyldidodecylammonium bromidem, poly(laktidem-co-glykolidem) a 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocholinem (Li et al. 2012).

Další výhodou polymerních nosičů léčiva či kontrastní látky je možnost specifického zacílení do nádorové tkáně. Tento aspekt bude popsán v kapitole 2.2.2. .

2.2.1.1. *Lineární polymery*

Lineárních polymerů je mnoho druhů, nicméně nejvíce prozkoumané a již v klinické praxi používané jsou dva z nich, PEG (polyethylenoxid dříve nazývaný polyethylenglykol) a polyHPMA (poly[N-(2-hydroxypropyl)metakrylamid]) (Larson and Ghandehari 2012). Oba patří mezi nebiodegradovatelné polymery, což přináší riziko akumulace v tkáních. Zároveň ale patří také mezi hydrofilní polymery, což je výhodné pro vazbu jinak hydrofobních léčiv (Duncan and Vicent 2010).

Počátek výzkumu zabývajících se studiem vlastností kopolymerů HPMA je v 70. letech (Kopecek and Kopeckova 2010). HPMA kopolymery byly široce studovány jakožto polymerní nosiče pro léčiva, která jsou hydrofilní a biokompatibilní. V roce 1994 byly HPMA kopolymery schváleny jako první polymerní konjugáty pro klinické testování v léčbě rakoviny. V posledních letech se pak výzkum HPMA kopolymerů zaměřoval na vylepšení první generace těchto látek s využitím nových poznatků. Například HPMA kopolymery nesoucí kombinaci léčiv nebo léčivo, které je uvolněno na základě změny pH (Larson and Ghandehari 2012).

PEG lze kovalentně navázat na povrch jiných nanočástic, kde slouží k jejich opláštění (*coating*). Jakožto biologicky inertní polymer pak redukuje imunogenicitu a snižuje vychytávání retikuloendotelovým systémem, což má za následek zvýšení hladin částic v krvi (Faraji and Wipf 2009).

2.2.1.2. *Micely a liposomy*

Micely jsou částice dosahující velikosti 5 - 150 nm skládající se z amfifilních molekul. Agregace těchto molekul do micel je samovolná při dosažení tzv. kritické micelární koncentrace (CMC, *critical micelle concentration*) (Larson and Ghandehari 2012). Povrch micel je hydrofilní, jádro je hydrofobní a může tak sloužit k uzavření hydrofobních léčiv a jejich následnému transportu v krevním řečišti. Distribuce velikostí micel je zpravidla úzká z termodynamických důvodů, což je výhodné z důvodů uniformního chování celého systému. Léčivo může být uzavřeno do micely dvěma způsoby a to fyzikálně enkapsulací nebo chemicky kovalentní vazbou (Cho et al. 2008). Micely mohou být také syntetizovány jako senzitivní k pH a uvolnit léčivo či kontrastní látku v nádoru, kde je obecně nižší pH (obvykle pod hodnotou 7) (Gao et al. 2013).

Liposomy jsou taktéž samovolně vznikající částice. Na rozdíl od micel jejich povrch netvoří jediná vrstva molekul, ale je tvořen fosfolipidovou dvojvrstvou (Cho et al. 2008). Vnitřní část liposomu tak není hydrofobní, ale hydrofilní a může tak uzavřít hydrofilní léčivo ve vodném prostředí. Fosfolipidová dvojvrstva může sloužit k enkapsulaci hydrofobních látek (Faraji and Wipf 2009), zejména u liposomů s multilamelární membránou (Svenson and Tomalia 2005).

Liposomy jsou široce využívány především v kosmetickém průmyslu. Využití v medicíně i přes jejich dobrou biokompatibilitu limituje biologická stabilita (Faraji and Wipf 2009).

2.2.1.3. *Dendrimery*

Dendrimery jsou hypervětvené makromolekuly na bázi polymerů, které se větví pomocí monomerních (příp. oligomerních) jednotek z centra molekuly k periferii a s každou vrstvou se počet periferních jednotek zdvojnásobuje či ztrojnásobuje (Faraji and Wipf 2009). Tato jejich unikátní struktura umožňuje maximalizovat možnosti pro biologické interakce dendrimerů. Fyzikálně chemické vlastnosti dendrimerů jsou pak určeny

složením centra (*core*), typem monomerních jednotek a modifikacemi povrchu (Larson and Ghandehari 2012).

Mezi výhody polymerních systémů založených na dendrimerech patří snadná chemická modifikace povrchu, kde může proběhnout konjugace s více typy molekul, jako jsou například kontrastní látky, látky pro multimodální zobrazování, léčiva, případně také cílicí ligandy (Cho et al. 2008). Jsou snadno syntetizovatelné s možností kontroly velikosti syntetizovaných částic. Díky těmto vlastnostem se tedy zdají jako ideální systém pro "*drug delivery*". V některých případech (zvláště u syntetických dendrimerů) chybí data o jejich cytotoxicitě, biodistribuci a biodegradabilitě (Faraji and Wipf 2009). Většina studií cytotoxicity dendrimerů byla pak prováděna *in vitro* (Svenson and Tomalia 2005).

Dendrimery mohou sloužit jako nanoléčiva, DNA a siRNA vektory, k diagnostice nádorů, kontrastní látky pro MRI, částice pro "*drug delivery*" (Menjoge et al. 2010). Ve vodě rozpustné dendrimery byly také využity pro zobrazování pomocí výpočetní tomografie (CT) (Svenson and Tomalia 2005).

Nejstarší a nejvíce studovanou skupinou dendrimerů jsou polyamidoaminové (PAMAM) syntetické dendrimery. Enkapsulace cisplatiny, rakovinného léčiva, do dendrimeru PAMAM dala vznik konjugátu, který oproti volné cisplatině vykazoval vyšší akumulaci v nádoru, nižší toxicitu pro zdravou tkáň a pomaleji se uvolňoval (Svenson and Tomalia 2005). Míra cytotoxicity PAMAM dendrimerů je ovlivněna koncentrací, nábojem povrchu a počtem vrstev větvení. Ke snížení toxicity může vést modifikace povrchu (např. konjugace s PEG), efektivnější cílení do nádoru a také kontrola velikosti (generace dendrimeru) (Menjoge et al. 2010).

Mezi dendrimery přírodního původu se řadí i námi testovaný značený GG.

2.2.2. Nádorové cílení, cílená doprava a řízené uvolňování léčiv ("drug delivery")

2.2.2.1. Pasivní akumulace EPR efektem

Cílení pomocí "*enhanced permeation and retention*" (EPR) efektu představuje v současné době jakýsi zlatý standard pro vývoj a cílení nanočástic k diagnostice a léčbě solidních tumorů.

Jev, později nazvaný jako EPR efekt, byl poprvé charakterizován Y. Matsumurou a H. Maedou v roce 1986, kdy ověřovali a zpřesňovali jeden svůj předchozí poznatek z výzkumu konjugátu nazvaného SMANCS. V tomto konjugátu byl jako protinádorové léčivo navázán Neocarzinostatin. Akumulace v nádoru byla v případě SMANCS zvýšena oproti volnému Neocarzinostatinu. Rozhodli se tedy tento jev přesněji analyzovat a zjistili, že zvýšená akumulace mnoha proteinů větších než 30 kDa v nádoru je zapříčiněna specifiky jeho krevního zásobení a lymfatického odtoku (Matsumura and Maeda 1986).

EPR efekt je způsoben vysokou propustností krevních kapilár nádorové tkáně (pevných nádorů) a špatným či zcela chybějícím odtokem lymfy (Fang et al. 2011, Taurin et al. 2012). Nádor, který přesáhne rozměr jednotek milimetrů, stimuluje tvorbu nových kapilár, neboť jinak upadá do dormantního stádia při velikosti okolo 2-3 mm (Folkman 1971). Tyto nové cévy se tvoří rychle (růst nádoru je obecně rychlejší než růst nenádorové tkáně), tudíž nepříliš kvalitně a s fenestracemi. Tyto fenestrace mohou dosahovat rozměrů 200 až 2000 nm. Cévy také postrádají jednu ze základních složek endotelu - bazální membránu (Bertrand et al. 2014). Že je tvorba nových cév podmíněna činností nádoru prokázali roku 1970 J. Folkman, E. Merler et al. . Z nádorů izolovali faktor zodpovědný za tvorbu nových cév v nádoru, který označili jako "nádorový angiogenetický faktor" (TAF, *tumor-angiogenesis factor*) (Folkman et al. 1971). Mezi další faktory podílející se na EPR efektu patří bradykinin, NO, prostaglandiny, inhibitory angiotenzin-konvertujícího enzymu (inhibitory ACE) a vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) (Fang et al. 2011).

Nanočástice nejsou díky své velikosti (> 40 kDa, > 7 nm) filtrovány do moči, protože jejich velikost přesahuje renální práh filtrace (velikost mezer mezi výběžky podocytů). Jejich poločas v cirkulaci je tak prodloužen stejně jako je zvýšena AUC (*area under the concentration-time curve*, plocha pod křivkou). Také neprocházejí nepatologickou cévní stěnou. Do cév tvořených okolo nádorové tkáně však proniknou a díky výše zmíněnému zhoršenému odtoku lymfy se tam i zdrží (Fang et al. 2011, Taurin et al. 2012). Výše uvedené charakteristiky EPR efektu shrnují, proč je tak populární jako nástroj pro pasivní cílení nanočástic do nádoru.

Přestože se tento mechanismus zdá velice elegantní a univerzální musíme zvážit nehomogenitu nádorové tkáně a to jak mezi jednotlivými typy nádorů, tak i v rámci buněčné populace jednoho nádoru. Například některé druhy nádorů nejsou dostatečně krevně zásobeny pro využití tohoto efektu (prostata, pankreas) (Taurin et al. 2012). Ve větších nádorech pak v centru převažuje nekróza, v širším centru hypoxie (Coleman et al. 2002, Hockel and Vaupel 2001). I přes tyto naznačené problémy při univerzálním používání EPR efektu představuje tento princip slibnou strategii pro další vývoj nanočástic pro cílenou akumulaci léčiv v mnoha typech pevných nádorů.

2.2.2.2. Ligandové cílení

Ligandové cílení využívá skutečnosti, že většina nádorů hyperexprimuje některé druhy receptorů, které jsou ve zdravé tkáni buď nepřítomné nebo ve sníženém množství, případně exprimované pouze v určité životní fázi (nejčastěji embryonální) (Hrubý et al. 2006). Mezi takovéto receptory patří například VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*, receptor pro vaskulární endotelový faktor), EGFR (*epidermal growth factor receptor*, receptor pro endotelový růstový faktor), HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*, receptor pro lidský epidermální růstový faktor subtyp 2) a folátový receptor (neboli receptor pro kyselinu listovou), přičemž cílení na tento receptor můžeme zařadit i do kategorie cílení preferenčním vychytáváním vitamínů a živin u nádorové tkáně. EGFR a HER2 patří do stejné rodiny receptorů, a to

"HER family". EGFR je nazýván také HER1 a HER2 je označován též jako ErbB2 (Chen et al. 2013).

Cílení na VEGFR bylo použito u konjugátu založeném na dendrimeru PAMAM. K tomuto konjugátu byl připojen VEGF, jakožto ligand a cílicí struktura, dále fluorescenční značka Cy5 (vhodná pro *in vivo* zobrazování) a také sloučeniny bóru pro následnou neutron záchytovou terapii (*boron neutron capture therapy*) (Backer et al. 2005).

Problémy ligandového cílení spočívají mimo jiné v tom, že hyperexprimované receptory se mezi různými typy nádorů liší, tudíž zatím není možné cílit na jeden univerzální receptor. Dále se liší exprese receptorů i v rámci jednoho nádoru (různé populace buněk, různé stadium vývoje) a v neposlední řadě může problém představovat i negativní zpětná vazba a následná snížená exprese (downregulace) konkrétního receptoru v nádoru (Hrubý et al. 2006).

2.2.2.3. Další druhy cílení

Cílení může být také lokální aplikací, kdy je léčivo aplikováno přímo na místo určení. Pro využití v onkologii jsou studovány především intratumorální injekce či různé chirurgické implantáty. Přestože je tento druh cílení nejjednodušší, nelze ho využít univerzálně. Je zcela vyloučen u metastáz a anatomicky špatně přístupných nádorů.

Mezi další druhy cílení můžeme řadit cílení pomocí preferenčního vychytávání vitamínů a různých živin nádorem a cílení fyzikální aktivací zevnějšku organismu (tepelná aktivace, magnetické cílení, cílení neutronovým svazkem a fotodynamická terapie). Dále lze také využít nižší pH nádoru a tudíž selektivní štěpení při tomto pH či selektivní enzymatickou aktivaci léčiva v nádorové tkáni určitými, pro tuto tkáň specifickými, enzymy (např. některé druhy metaloproteas) (Hrubý et al. 2006).

Pro cílení pomocí preferenčního vychytávání vitamínů se v současné době studuje využití kyseliny listové (vitamín B₉). Receptor pro kyselinu listovou (FR, *folate receptor*), který zprostředkovává její vychytávání

za fyziologických podmínek, je ve zvýšené míře exprimován u mnoha typů nádorů. V potaz je třeba brát i fyziologickou expresi FR v ledvinách, což může způsobit nechtěnou akumulaci léčiva cíleného na FR v tomto orgánu (Leamon and Low 2001). Výhod vazby ligandu pro FR na polymer, nikoliv pouze na léčivo, je několik. Především je omezena rychlá filtrace a reabsorbce ledvinami, protože polymerní konjugáty přesahují svou velikostí renální práh filtrace. Dále je také možné navázat více molekul léčiva na jeden polymer cílící na FR, nikoliv pouze jednu molekulu léčiva k jedné molekule kyseliny listové, jak je tomu u nepolymerních systémů (Russell-Jones et al. 2004). Kyselina listová může být navázána takřka k jakékoli makromolekule pomocí kovalentní vazby. Chování a buněčné vychytávání tohoto konjugátu je pak srovnatelné s nevázanou kyselinou listovou (Leamon and Low 2001).

Magnetické cílení je založeno na injekční aplikaci magnetické nanočástice s navázaným léčivem do arterie zásobující nádor za přítomnosti silného vnějšího magnetického pole, které tyto částice dále směřuje k nádorové tkáni (Lubbe et al. 2001). Účinnost cílení magnetických nanočástic závisí na síle magnetického pole (Alexiou et al. 2002) a také na krevním zásobení nádoru (cíleného místa) (Alexiou et al. 2005). Tento druh cílení v *in vivo* studiích u králíka zvýšil koncentraci magneticky cílených částic oproti nanočásticím bez cílení (Alexiou et al. 2002). Také pomocí něj bylo možné snížit dávku chemoterapeutika nutného k remisi nádorového onemocnění, přičemž nebyly pozorovány vedlejší účinky chemoterapeutik (Alexiou et al. 2005).

2.2.3. *Metody diagnostiky a zobrazování*

Zobrazovací metody v medicíně nám umožňují vizualizovat i vnitřní struktury těla a tak pomáhají diagnostice, která by byla bez nich v mnoha případech nemožná. Můžeme je rozdělit do dvou hlavních skupin na anatomické a funkční zobrazovací metody. Anatomické metody poskytují informaci o struktuře a uložení tkání a orgánů. Funkční metody pak informují například o metabolismu v jednotlivých orgánech, průtoku krve orgány aj. V současné době se však spolu s rozvojem nových technologií hranice mezi těmito dvěma skupinami stírají. Do první skupiny patří magnetická rezonance a výpočetní tomografie (CT), do druhé pak pozitronová emisní tomografie (PET), funkční magnetická rezonance (fMRI), jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT) (Kherlopian et al. 2008).

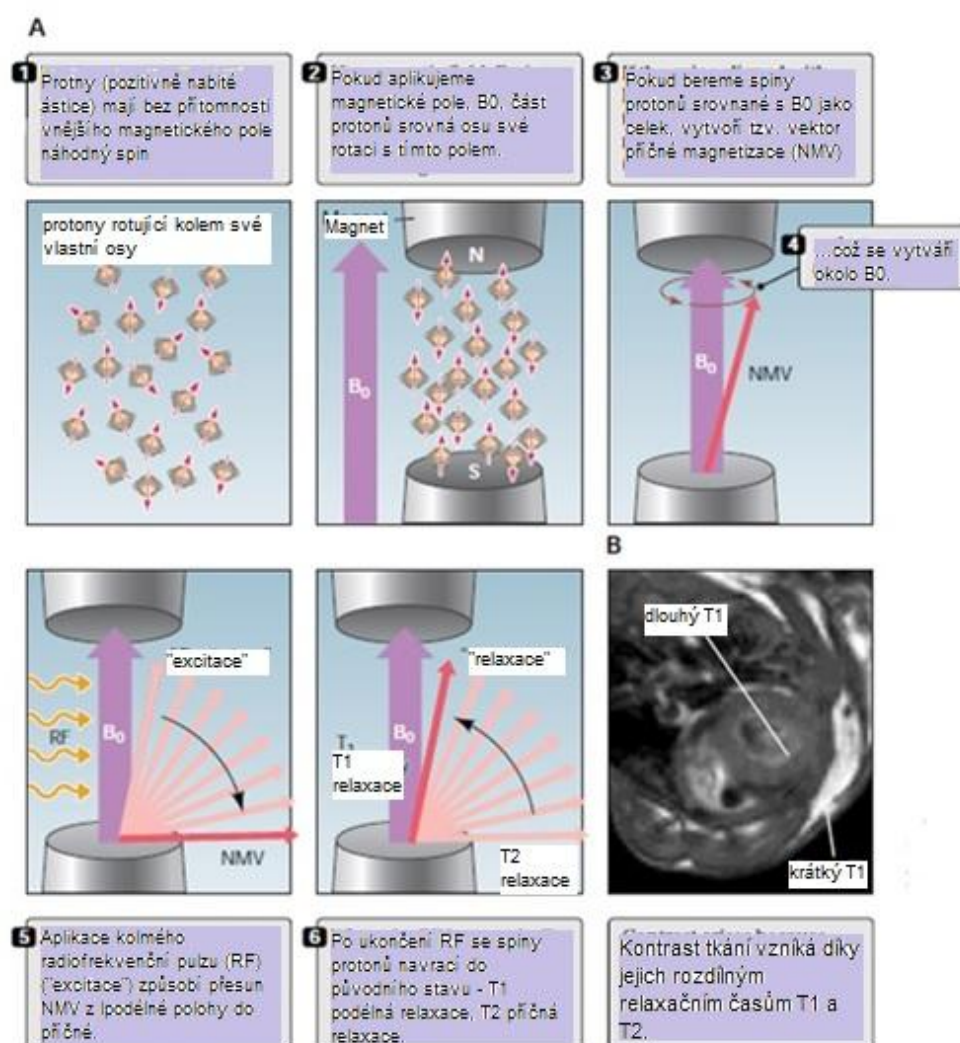
Vzhledem ke konstrukci námi využívaných sond bude popsáno pouze zobrazování pomocí MRI a fluorescenčních sond.

2.2.3.1. *MRI*

Magnetická rezonance (MRI, *magnetic resonance imaging*) je neinvazivní způsob anatomického zobrazování, pomineme-li fMRI, která se využívá i pro funkční zobrazování. Mezi jeho výhody patří především to, že organismus nezatěžuje ionizujícím zářením jako jiné zobrazovací metody (PET, CT). V současné době může MRI dosáhnout rozlišení až pouhých 10 - 50 μm .

Princip MRI využívá náboj a spin jader atomů vodíku. Jádro atomu vodíku ^1H (proton) je pro toto zobrazování velmi vhodné z hlediska jeho značného zastoupení v tkáních a vysoké relativní citlivosti. V silném magnetickém poli se spiny jednotlivých protonů uspořádají dle tohoto magnetického pole B_0 . Následně se aplikuje radiofrekvenční puls v úhlu 90° k magnetickému poli B_0 a tím se vytvoří magnetické pole B_T (transverzální). Aplikace tohoto pulsu se označuje jako "excitace", po jeho ukončení protony uvolňují absorbovanou energii a zároveň se vrací ke svému původnímu

spinu - relaxují. Schéma mechanismu zobrazování pomocí MRI je na Obr. 4 (Pautler 2004).



Obrázek 4: Schéma principu MRI.
Upraveno dle Pautlera (Pautler 2004).

Zobrazování pomocí MRI může být T_1 nebo T_2 vážené. T_1 se označuje jako relaxace "spin-mřížka" (jádro vydává svou absorbovanou energii do okolí), T_2 pak jako "spin-spin" relaxace (jádro vyměňuje absorbovanou energii s ostatními jádry atomů). Kontrast u MRI je dán rozdílným složením tkání, čímž také dochází k rozdílným v T_1 a T_2 relaxaci mezi jednotlivými tkáněmi. Nádorová tkáň má vysoký obsah vody a obvykle se tak v případě T_1 váženého obrazu jeví tmavá, u T_2 váženého obrazu je tomu naopak.

Přirozený kontrast mezi tkáněmi může být dále zvýšen pomocí exogenních MRI kontrastních látek. Mezi tyto látky patří gadolinium (Gd^{3+}), mangan (Mn^{2+}) a železo (Fe^{3+}) (Edelman and Warach 1993, Pautler 2004).

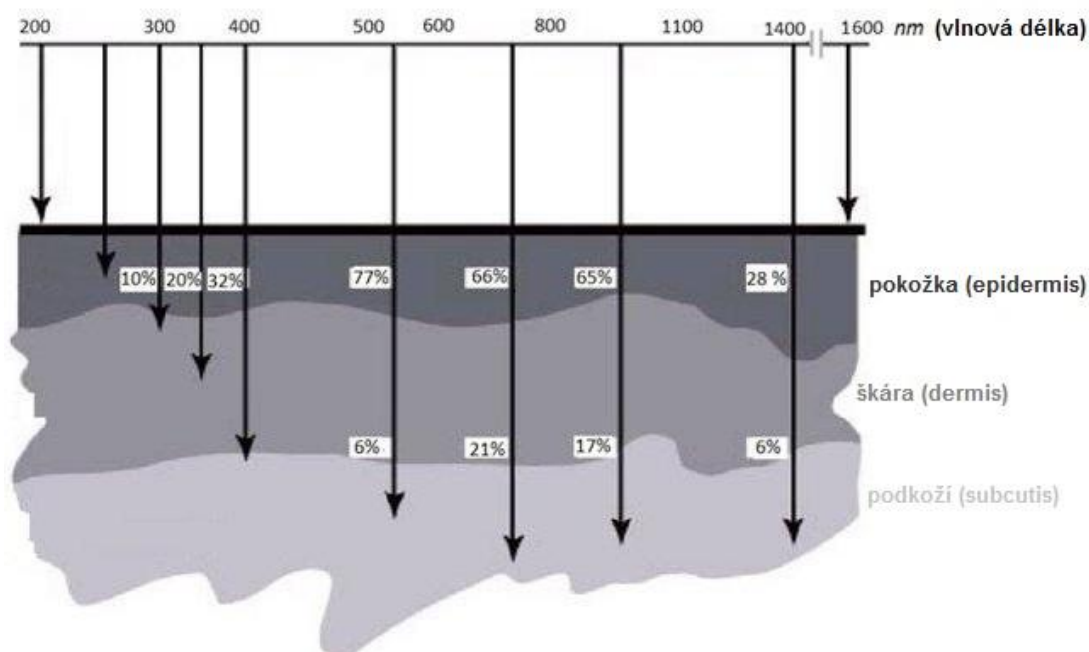
V systémech pro theranostiku se studuje pro zlepšení kontrastu u MRI výše zmíněný Mn^{2+} v kombinaci s Doxorubicinem jako léčivem proti nádorovým onemocněním. Tyto dvě složky jsou uzavřeny v lipozómu, pouze po uvolnění z něj pak Mn^{2+} zvyšuje rozlišení pro MRI. Další používanou kontrastní látkou pro MRI je gadolinium. Rozvoj theranostických systémů založených na Gd byl urychlen také otázkou ohledně toxicity Mn^{2+} . Gadolinium je již klinicky používaný a schválený kontrast pro vyšetření magnetickou rezonancí v dávce typicky kolem 0,1 mmol/kg (Moore et al. 2014). Gadolinium jakožto kontrastní látka pro MRI byla použita i v námi syntetizovaném a testovaném multimodálním zobrazovacím polymerním systému. V každém případě musí být trojmocné gadolinium chelatováno v silném komplexu, protože volné má nepříjemnou toxicitu. Využití Fe^{3+} v nanomedicině je spojeno především s magnetickými nanočásticemi (Jun et al. 2008).

MRI nám tedy umožňuje relativně snadno, rychle a neinvazivně určit lokalizaci nanočástice a případné uvolňování léčiva. Díky vysokému rozlišení poskytuje detailní informace o distribuci nanočástic v nádorové tkáni, případně i v jiných tkáních (Moore et al. 2014).

Další žádoucí vlastností je možnost zvýšit kontrast nanočástic v nádorové tkáni alternací relaxace spinu molekul vody sousedících s danou nanočásticí, toto platí například pro magnetické nanočástice (Jun et al. 2008).

2.2.3.2. *In vivo fluorescence*

In vivo fluorescence se v současné době využívá především pro celotělové zobrazování malých zvířat ve výzkumu. Při použití fluorescenčního zobrazování *in vivo* musíme, na rozdíl od fluorescence *in vitro*, překonat několik problémů. Mezi dva hlavní patří za prvé absorpce excitačního i emisního světla v tkáni (graf znázorňující vliv vlnové délky na absorpci, respektive propustnost, vrstvami kůže viz Obr. 5), tudíž neschopnost proniknout a zobrazit hlouběji uložené struktury. Například i malá zvířata, jako jsou myši, se lépe zobrazují, pokud postrádají srst. Druhou významnou překážkou *in vivo* fluorescenčního zobrazování je autofluorescence tkání. Tento problém lze omezit použitím blízkého infračerveného spektra (NIR, *near infrared*) pro zobrazování *in vivo*, kde většina tkání má autofluorescenci již značně omezenou. Vhodné rozmezí vlnových délek v NIR je cca 700 - 1000 nm (Frangioni 2003, Rao et al. 2007).



Obrázek 5: Propustnost světla vrstvami kůže v závislosti na vlnové délce. Množství propuštěného světla v procentech. Upraveno dle (SKA Polska) .

Zobrazování pomocí NIR spektra se může využít pro detekci apoptózy po podání chemoterapeutika (antiproliferativních léčiv), tudíž je možné sledovat konkrétní účinky chemoterapeutika na nádor *in vivo* a v reálném čase neinvazivním způsobem. Takto byla použita kombinace annexinu-V (marker apoptózy) s fluorescenční barvou Cy5.5 (jeden z typů fluorescenční barvy cyaninu), kde se fluorescenční signál z NIR spektra zvýšil po podání antiproliferativního léčiva. Testování probíhalo na myších a u dvou typů nádorů (Petrovsky et al. 2003).

2.2.3.3. Multimodální zobrazování

Multimodální zobrazování umožňuje využít výhody více zobrazovacích metod a omezit tak jejich nedostatky, například nízké rozlišení nebo citlivost. Kombinace více modalit v systému umožňuje citlivější a variabilnější detekci nádorů, zejména pokud jsou kombinovány modalitty anatomické s modalitami funkčními. Nanočástice pak představují ideální platformu pro kombinování různých kontrastních látek. To platí i pro micely, liposomy a dendrimery, stejně jako pro kvantové tečky a magnetické či kovové částice, které již jednu zobrazitelnou modalitu obsahují (Louie 2010). Například kombinace značení radionuklidem a fluorescenční sondou umožňuje efektivní předoperační diagnostiku pomocí detekce radionuklidu. Fluorescenční sonda pak může být využita při operaci k přesné lokalizaci léze. Takto lze obejít i hlavní problém *in vivo* fluorescence, a to neprůchodnost světla větší vrstvou tkáně (Kuil et al. 2010).

Pro multimodální zobrazování byly také vyvinuty dnes již komerčně dostupné speciální přístroje kombinující více zobrazovacích modalit. Jako první byl vyvinut hybridní přístroj kombinující PET a CT, následoval ho PET s MRI (Louie 2010).

2.3. Glykogen jako polymerní nosič

O syntéze glykogenu pro potencionální využití jakožto biodegradovatelného biomateriálu v medicíně se zmiňuje článek od H. Izawi, et al., kde popisují přípravu polysacharidů na bázi glykogenů pomocí elongace glykogenu, jakožto primeru, přidáním glukóza-1-fosfátu a enzymu fosforylázy. Touto metodou se jim podařilo připravit hydrogel, který byl lyofilizací přeměněn na xerogel, přičemž tato změna byla reverzibilní (Izawa et al. 2009).

Glykogen zatím nebyl dostatečně probádán jakožto systém pro "drug delivery", tímto jeho využitím se zabývá pouze naše skupina, je-li nám známo. Nicméně jeho vlastnosti jsou pro toto využití značně výhodné. Patří do skupiny dendrimerů, tudíž je snadno modifikovatelný a lze k němu připojit jak kontrastní látku, tak i fluorescenční značku či léčivo. Je to také finančně relativně nenákladný materiál z obnovitelného zdroje.

Pro "drug delivery" byl testovány čtyři typy komerčně dostupných glykogenů - ústřičný, hovězí, králičí a ze slávy. Na základě různých testů byl jako optimální pro chemické modifikace a další testování vybrán glykogen ústřičný. Tento glykogen byl modifikován připojením 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraacetonové kyseliny s gadoliniovým (III) komplexem (DOTA-Gd), jakožto kontrastem pro MRI, a Dyomicsem 615, který slouží jako fluorescenční značka. S tímto modifikovaným glykogenem pak byly provedeny dva testy. *In vitro* cytoplazmatická lokalizace na 4T1 buňkách (myší rakovinné buňky nádoru mléčné žlázy) a *in vivo* test na zdravých myších kmene C57/B16, kde se sledoval osud látky v organismu (Filippov et al. 2012). Další testy pak byly provedeny v rámci této diplomové práce.

2.3.1. *Degradace externě podaného značeného glykogenu*

Otázkou zůstává, zda jsou nanočástice na bázi GG po internalizaci do buňky štěpeny klasickou fyziologickou cestou pomocí enzymů pro degradaci GG (GP, GDE, PGM), přestože byly podány nefyziologicky (GG běžně v krevním řečišti nevyskytuje) nebo zda se dostávají do lysozómů. Lysozomy jsou orgány obsahující mnoho typů enzymů pro degradaci makromolekul za výrazně nižšího pH ($\text{pH} \approx 4,8$) (Lodish et al. 1999). Degradaci glykogenu pak zajišťuje lysozomální α -glykosidáza (kyselá maltáza), která je schopná štěpit α -(1 \rightarrow 4) i α -(1 \rightarrow 6) vazbu (Lloyd and Mason 1996). Rychlost degradace glykogenu v lysozómech je nejvyšší při $\text{pH}=5$ (Mahadevan et al. 1969).

Obě cesty degradace externě podaného glykogenu jsou tedy z fyziologického hlediska reálné. K objasnění, která z nich se uplatňuje v případě glykogenových nanočástic, bude třeba ještě dalšího výzkumu.

3. Cíle práce

Nádorová onemocnění patří mezi jednu z nejčastějších příčin úmrtí s předpokladem dalšího vzestupu výskytu těchto onemocnění, jak bude populace stárnout. Proto je nyní kladen důraz na vývoj nových účinnějších, biodegradovatelných a biokompatibilních léčiv pro snadnou a včasnou diagnostiku a efektivní léčbu nádorů. Tyto charakteristiky léčiv mohou být splněny za pomoci rychle se rozvíjející oblasti tzv. "*drug delivery*" systémů neboli polymerních nosičů léčiva s efektivním cílením do nádoru.

Cílem této práce bylo charakterizovat biologické vlastnosti multimodálních sond na bázi přírodního glykogenu. V rámci této práce jsem zjišťovala:

- zda se je externě podaný (rozpuštěný v kultivačním médiu) glykogen vychytáván buněčnou linií HepG2,
- jaký je časový průběh tohoto vychytávání externě podaného glykogenu *in vitro* u buněčné linie HepG2,
- jaký vliv na vychytávání externě podaného glykogenu má jeho chemická modifikace,
- jaká je intracelulární lokalizace exogenně podaného glykogenu a jeho degradace,
- jakým způsobem probíhá internalizace externě podaného modifikovaného glykogenu,
- míru cytotoxicity těchto sond,
- jaká je tkáňová distribuce multimodálních sond na bázi přírodního glykogenu *in vivo* po aplikaci s.c. a i.v. a jaký je časový průběh této distribuce.

4. Materiály a metody

4.1. Použité buněčné linie, zvířecí modely, chemikálie, materiál a přístroje

4.1.1. *Buněčná linie*

- HepG2 - dodavatel ATCC® (USA, sídlo pro střední Evropu – Polsko), ATCC® HB-8065™

4.1.2. *Zvířecí model*

- CD1-Nude: 3 myši samice staré 5 týdnů v době pokusu, Charles Rivers Laboratories (USA)

4.1.3. *Chemikálie*

- **Sterilní:**
 - 2% isofluoran - Chiesi Pharmaceuticals GmbH (Rakousko)
 - 200mM roztok L-glutaminu - Sigma-Aldrich® (USA)
 - cytochalasin D "ready made solution" 5 mg/ml v DMSO - Sigma-Aldrich® (USA)
 - Dulbecco's PBS (1x) - PAA Laboratoires (Rakousko)
 - ER-Tracker™ Blue-White DPX - Invitrogen™ od LifeTechnologies™ (USA)
 - fetální bovinní sérum - Gibco® od LifeTechnologies™ (USA)
 - Hank's Balanced Salt Solution (bez fenolové červeně, hydrogenuhličitanu sodného, vápníku a hořčíku) - Biowest (Francie)
 - Hoechst 33342 - Invitrogen™ od LifeTechnologies™ (USA)
 - infuzní (fyziologický) roztok pro intravenózní podání - Ardeapharma, a.s. (Česká republika)
 - LysoTracker® Deep Red - Invitrogen™ od LifeTechnologies™ (USA)

- médium (Minimal Essential Medium bez fenolové červeně) - Gibco® od LifeTechnologies™ (USA)
- methyl-β-cyklodextrin - Sigma-Aldrich® (USA)
- MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5diphenyl-2H-tetrazolium bromide) - Sigma-Aldrich® (USA)
- neesenciální aminokyselinový roztok pro MEM (*MEM non.essential amino acid solution*) 100x - Sigma® Life Science (USA)
- penicilin-streptomycin (100x) - Sigma-Aldrich® (USA)
- sacharóza BioUltra pro molekulární biologii - Sigma-Aldrich® (USA)
- trypsin-EDTA (1x) - Gibco® od LifeTechnologies™ (USA)
- **Nesterilní:**
 - DMSO - Sigma-Aldrich® (USA)
 - glycinový pufr (0,1 M glycine + 0,1 M NaCl, pH 10,5), objem 0,5 l
 - glykogen-FITC
 - glykogen-POX-FITC
 - glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615
 - glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolin) s vyšším obsahem polyoxazolinu (přesný obsah viz kapitola 4.2.)
 - glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolin) s nižším obsahem polyoxazolinu (přesný obsah viz kapitola 4.2.)

4.1.4. Materiál

- **Sterilní:**
 - 6 jamková destička - TPP® (Švýcarsko)
 - 24 jamková destička - TPP® (Švýcarsko)
 - 96 jamková destička - SPL Life Sciences Co., Ltd. (Korea)
 - falkonky 50 a 15ml - Orange Scientifics (Belgie)
 - kulatá krycí sklíčka o průměru 1 cm - Marienfeld-Superior® (Německo)
 - kultivační lahve o velikosti dna 25 cm² - Orange Scientifics (Belgie)

- Millicell® EZ slides (4 komůrky na podložním sklíčku) - Merck Millipore (Irsko)
 - Petriho misky o průměru 4 cm a 10 cm - Orange Scientific (Belgie)
 - stříkačka injekční inzulinová pro jedno použití (1 ml) - Chirana T. Injecta, a.s. (Slovensko)
 - vaničky k vícekanálovým pipetám 50ml - Biologix Group Limited (Čína)
 - zkumavky pro přístroj Vi-Cell - Beckman coulter, Inc. (USA)
 - další běžný spotřební materiál: špičky k automatickým pipetám, sérologické pipety
- **Nesterilní:**
 - chirurgické nástroje (2x nůžky, 2x pinzeta) - MEDIN® (Česká republika)
 - komůrka pro aplikaci do ocasní žíly myším - výroba na zakázku pro 1. LF UK
 - další běžný spotřební materiál: potřeby k vážení (váženky, lžičky...), alobal

4.1.5. Přístroje

- automatické pipety - Eppendorf Research® Plus (Německo)
- automatická pipeta 12- a 8-kanálová - Rainin Instrument, LLC (USA)
- centrifuga, typ Rotofix 32A - Hettich Zentrifugen (Německo)
- CO₂ inkubátor 5215-2 - ShellLab® (USA)
- elektroporátor Vi-Cell XR - Beckman coulter, Inc. (USA) se softwarem Vi-Cell (Beckman coulter, Inc.)
- inverzní mikroskop pro tkáňové kultury - Optika Microscopes (Itálie)
- kombinovaný destičkový fotometr - BioTek® Instruments, Inc. (USA), Synergy™ 2, software od firmy BioTek® Instruments, Inc. (USA) - Gen5™
- konfokální mikroskop SPE - © Leica Microsystems (Německo), se softwarem LAS AF od Leica Application Suite - Advanced Fluorescence

- konfokální mikroskop SP2 AOBS - © Leica Microsystems (Německo), se softwarem Leica LCS od Laser Confocal Software
- mikrocentrifuga - Labnet International, Inc. (USA)
- pipetovací nástavec, typ pipetus® - Hirschmann® Laborgeräte (Německo)
- pH metr CyberScan510^{PC} - EUTECH Instruments, Thermo Scientific (USA)
- předvážky, typ BPS 41 - BOECO (Německo)
- sterilní box, typ SafeFlow 1.2 - BIOAIR® A EuroClone® Division (Itálie)
- sterilní box, typ SafeFlow 1.8 - BIOAIR® A EuroClone® Division (Itálie)
- systém pro anestézii zvířat pro IVIS® Lumina XR, typ XGI-8 Gas Anesthesia System - PerkinElmer, Inc. (USA)
- třepačka, typ PMS-1000 - Grant-bio (Anglie)
- váhy analytické - BOECO (Německo)
- váhy laboratorní, typ HF – 200G - A&D Weighing (USA)
- vodní lázeň třepací, typ SW23 - Julabo, Inc. (USA)
- vortex, typ VX100 - Labnet, Inc. (USA)
- zobrazovací systém biotonický, typ IVIS® Lumina XR - Caliper Life Science, nyní PerkinElmer, Inc. (USA), software: Living Image Software, PerkinElmer, Inc.

4.1.6. Statistické vyhodnocení

Statistické hodnocení jsme provedli pouze v případě MTT testu cytotoxicity, kde jsme použili metodu dvoucestné ANOVY v programu GraphPad InStat 3 (GraphPad Software, Inc., USA).

4.2. Typy jednotlivých značených glykogenů

Všechny značené GG byly syntetizovány v Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i., a vycházeli z ústříčného GG od firmy Sigma-Aldrich®. V diplomové práci jsme použili pět odlišných typů modifikovaného GG, glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615, dva druhy glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolin), lišící se obsahem polyoxazolinu, glykogen-FITC a glykogen-POX-FITC. Všechny typy modifikovaných GG byly použity ve formě lyofilizátů.

Syntéza glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 vycházela z derivátu glykogenu obsahujícího primární aminokyseliny, který byl rozpuštěn ve vodě a byl k němu přidán Dyomics 615 NHS ester. Po třech hodinách při laboratorní teplotě byl ke směsi přidán DOTA NHS ester, a směs byla ponechána reagovat při laboratorní teplotě přes noc. Následně byl konjugát purifikován, rozpuštěn ve vodě a byl přidán octan amonný a gadolinium (III) chlorid hexahydrát. Směs se nechala vařit přes noc. Následnou purifikací vznikl výsledný produkt, který byl lyofilizován (Filippov et al. 2012).

Syntéza obou typů glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolin) vycházela ze zásobního roztoku GG. Zásobní roztok GG byl připraven smícháním 3,5 g GG s 50,5 ml DMSO, azeotropickým vysušením pomocí toulenu, následným odpařením toulénové frakce a přidáním hydridu sodného. Pro glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolin) s nižším obsahem polyoxazolinu bylo k 30 g zásobního roztoku GG přidáno 1,167 g roztoku poly(2-methyl-2-oxazolinu) s živým polymerizačním koncem. Pro glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolin) s vyšším obsahem polyoxazolinu bylo k 10 g zásobního roztoku GG přidáno 3,500 g roztoku poly(2-methyl-2-oxazolinu). Jako fluorescenční barva byl u obou typů použit dansyl.

Syntéza glykogenu-FITC vycházela z glykogenu obsahujícího primární aminokyseliny (stejně jako u glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615). 200 mg tohoto GG bylo rozpuštěno v 10 ml 0,1 M Na₂CO₃ a k roztoku byl přidán 1 ml roztoku FITC (připraven z 2 mg FITC a 2 ml DMSO). Směs byla míchána přes noc při pokojové teplotě a poté přečištěna gelovou permeační chromatografií a lyofilizována.

Syntéza glykogenu-POX-FITC vycházela z meziprojektu pro glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolin) s nižším obsahem polyoxazolinu, kdy 140 mg tohoto meziprojektu bylo rozpuštěno v 10 ml 0,1 M Na₂CO₃ a k roztoku bylo přidáno 0,7 ml roztoku FITC (připraven z 2 mg FITC a 2 ml DMSO). Směs byla opět míchána přes noc při pokojové teplotě, poté přečištěna gelovou permeační chromatografií a lyofilizována (Pospíšilová 2014).

4.3. Modelové buněčné linie a organismy

4.3.1. *HepG2*

HepG2 buněčná linie roste jako adherentní monovrstva shluků jednotlivých epiteliálních buněk. Výměna média probíhá jedenkrát týdně, jako médium se používá Minimum Essential Medium s 10 % fetálního bovinního séra, 5 % penicilinu/streptomycinu, 5 % L-glutaminu a 5 % neesenciálních aminokyselin.

Buněčná linie byla získána z hepatocelulárního karcinomu patnáctiletého chlapce. Tato linie netvoří nádory po injekčním podání imunosuprimovaným myším, nemůže být tedy použita pro *in vivo* studie. Dodavatel této linie je ATCC®(HepG2 [HEPG2] (ATCC® HB-8065™)) a byla použita ve všech *in vitro* experimentech (ATCC).

4.3.2. CD1®-Nude myš

CD1®-Nude myš byla vyšlechtěna sérií křížení a zpětných křížení z CD-1 myši, které se transfekoval "nahý gen" od kmene Crl:NU-Foxn1^{nu}. CD-1 kmen postrádá thymus, nevytváří tedy T-buňky a je proto imunodeficientní. V kombinaci s genem Crl:NU-Foxn1^{nu} jsou tyto myši tedy bez srsti a s poškozeným imunitním systémem. Počátky vývoje tohoto kmene se datují do roku 1979. Kmen byl vyšlechtěn firmou Charles Rivers Laboratories z Wilmingtonu (USA, Massachusetts). Tento myší kmen je vhodný pro studie v oblasti onkologie (snadná indukce nádorů) a také při sledování implantovaných štěpů tkáně (neodhojuje xenografty). Absence srsti usnadňuje *in vivo* fluorescenční zobrazování (Charles River Laboratories International).

4.4. Tkáňové kultury

Chceme-li provádět experimenty *in vitro* na buněčných liniích, musíme buňky pravidelně pasážovat. Interval závisí na typu buněčné linie a době buňky, ve které dosáhnou zhruba 80% konflunce. S buněčnými liniemi pracujeme ve sterilním boxu. Každých sedm dní buňkám nejprve odsajeme staré médium. Následně přidáme 5 ml Hanks'Balanced Salt Solution (pufr, který se používá v buněčných kulturách, pojmenován po John H. Hanksovi, který definoval jeho složení), který po krátké chvíli (do jedné minuty) odsajeme a přidáme 1 ml Trypsinu-EDTA. Buňky uložíme do inkubátoru na pět až šest minut, poté vyndáme a zkontrolujeme, zda se buňky oddělují ode dna kultivační lahve. Přidáme 4 ml média. Buňky opakovaně (zhruba 20x) nasáváme sérologickou pipetou tak, abychom oddělili shluky buněk. Následně přeneseme určitý objem staré buněčné kultury (1 ml pro ředění 1:4) do nové kultivační lahve a přidáme čerstvé médium na finální objem (u ředění 1:4 jsou to 4 ml). Zkontrolujeme v mikroskopu a uložíme do inkubátoru. Pravidelně pak kontrolujeme nárůst buněčné kultury. Všechny roztoky před přidáním k buňkám ohřejeme na 37°C. Všechny výše uvedené objemy platí pro kultivační lahev o ploše dna 25 cm² (Freshney 2000).

4.5. Měření hodnot fluorescence média

Princip metody

Pokud HepG2 buňky endocytují značený glykogen, který jim podáme rozpuštěný v příslušném médiu, měla by fluorescence tohoto média klesat v čase - fluorescenční značka by se spolu s glykogenem měla dostat do buněk. Pokud je značený glykogen intracelulárně degradován, značka se odštěpí a je-li exocytózou zpětně uvolněna do média, pak by měla hodnota fluorescence opět růst, a to až nad hodnotu iniciální kvůli sníženému objemu média po několika odběrech, do kterého je zpětně uvolňována. Pokud nebude fluorescenční značka exocytována zpět do média, fluorescence bude kontinuálně klesat. Z hodnot fluorescence média v různých časech pak můžeme usuzovat na průběh vychytávání značeného glykogenu HepG2 buněčnou linií.

Pracovní postup

HepG2 buňky staré 32 týdnů jsme 6 dní před experimentem přepasážovali do tří kultivačních lahví o ploše dna 25 cm², ředění 1:4.

Šestý den jsme připravili roztoky se značeným glykogenem. V první kultivační lahvi jsme vyměnili staré médium za 5 ml čerstvého média s glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 (zásobní roztok 16,7 mg na 5,5 ml média). V druhé kultivační lahvi jsme opět staré médium vyměnili za 5 ml nového, tentokrát s glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinem) s vyšším obsahem polyoxazolinu (zásobní roztok 16,9 mg na 5,5 ml média). Ve třetí kultivační lahvi jsme staré médium vyměnili za 5 ml nového s glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinem) s nižším obsahem polyoxazolinu (zásobní roztok 16,8 mg na 5,5 ml média). Všechny tři kultivační lahve jsme uložili do inkubátoru na třepačku, abychom zajistili rovnoměrný přístup všech buněk ke značenému glykogenu. V časech 5, 60, 120, 240, 480, 1440, 2880 a 7200 minut jsme vždy z každé kultivační láhve odebrali 200 µl média se značeným glykogenem, které jsme přepipetovali do 96 jamkové destičky. Následně jsme měřili hodnotu fluorescence na kombinovaném destičkovém

fotometru za použití band-pass filtrů, a to pro Dyomics 615 excitační 575/15 nm, emisní 620/40 nm, pro dansyl pak excitační 320/20 nm a emisní 485/20 nm. Jako blank jsme použili médium bez značeného glykogenu. Hodnotu senzitivity přístroje jsme nastavili na 50 pro glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 a na 80 pro oba typy glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolin).

4.6. Měření hodnot fluorescence média před a po odmytí značeného glykogenu

Princip metody

Vychytávají-li HepG2 buňky příslušný značený glykogen, který je jim podán v médiu, fluorescenční značka se akumuluje intracelulárně. Po intracelulární degradaci glykogenu je fluorescenční značka uvolněna a může být exocytózou dopravena zpět do média. Pokud tedy v určitý čas vyměníme médium se značeným glykogenem za médium čisté, měla by fluorescence v médiu stoupat, byla-li fluorescenční značka vychytána a následně uvolněna. Pokud se fluorescenční značka neakumulovala intracelulárně nebo není uvolňována zpět do média z buňky, fluorescence v čistém médiu bude na úrovni bazální fluorescence média.

Pracovní postup

HepG2 buňky staré 18 týdnů jsme přepasážovali do 6 jamkové destičky v ředění 1:4. Do jamek 1A a 1B 6 jamkové destičky jsme přidali 2 ml buněčné suspenze. Buňky jsme nechali v inkubátoru po dobu čtyř dní. Čtvrtý den ráno jsme připravili roztok značeného glykogenu. 15,3 mg glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinu) s vyšším obsahem polyoxazolinu jsme rozpustili v 4,2 ml média. Staré médium jsme odsáli a přidali jsme 2 ml média se značeným glykogenem. V časech 60, 120 a 270 minut jsme vždy z každé jamky odebrali do 96 jamkové destičky 200 µl média se značeným glykogenem. Následně jsme v čase 270 minut od přidání média se značeným glykogenem toto médium odsáli z obou jamek a k buňkám přidali čisté médium. V časech 90, 210 a 330 minut od výměny média za médium bez

značeného glykogenu jsme provedli opět odběry z obou jamek do 96 jamkové destičky, vždy 200 μ l. Hodnoty fluorescence odebraného média v 96 jamkové destičce jsme měřili pomocí kombinovaného destičkového fotometru za použití band-pass filtrů, a to excitační 320/20 nm a emisní 485/20 nm. Jako blank jsme použili médium bez značeného glykogenu. Hodnotu senzitivity přístroje jsme nastavili na 80.

4.7. Konfokální mikroskopie

Princip metody

Konfokální mikroskopie je speciálním druhem mikroskopie optické, oproti níž má vyšší rozlišovací schopnost danou omezením šumu nad a pod rovinou zobrazování - snímá pouze z pouze ohniskové roviny mikroskopu. Paprsek světla u konfokální mikroskopie prochází přes tzv. pinhole (zaostřovací clona), která nepropustí světlo, které by dopadlo mimo rovinu zaostření. Fluorescenční mikroskopie pak využívá excitačních laserů o definovaných vlnových délkách, které excitují fluorescenčně značený vzorek. Vzorkem emitované světlo prochází přes band-pass filtry, které mají různá rozmezí vlnových délek, které propouštějí.

Pracovní postup

6 dní před pokusem jsme buňkám odsáli médium, promyli pomocí Hank's Balanced Salt Solution a ztrypsinizovali. Přidali jsme médium na původní objem, buňky jsme zcentrifugovali (5 minut, 1500 RPM), odsáli médium a přidali 5 ml čerstvého média, následně jsme buňky spočítali na elektroporátoru. Dle výsledků jsme buňky naředili tak, aby v 1 ml média bylo 5 000 buněk. Buňky jsme posléze napipetovali buď do Millicell® EZ slides nebo do 24 jamkové destičky, do které jsme předtím na dno vložili vysterilizovaná krycí kulatá sklíčka.

Po šesti dnech jsme odsáli staré médium a k buňkám jsme přidali médium se značeným GG (čtyři hodiny před přidáním dalších fluorescenčních barev), pouze v jednom případě měření jsme značený GG přidali už po pěti dnech (24 hodin před přidáním dalších fluorescenčních

sond). Značený GG (glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615, glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolin) s nižším obsahem polyoxazolinu, glykogen-POX-FITC, glykogen-FITC) jsme vždy rozpouštěli v médiu na 0,3% koncentraci. Buněčnou kulturu jsme pokaždé uložili do inkubátoru na třepačku, abychom zajistili rovnoměrný přístup značeného GG k buňkám. Po 4 (či 24) hodinách jsme buď médium se značeným GG odsáli a vyměnili za čerstvé bez značeného GG, nebo jsme přidali fluorescenční barvy (ER-Tracker™ Blue-White DPX, LysoTracker® Deep Red, Hoechst 33342).

LysoTracker® Deep Red jsme nejdříve nechali ohřát na pokojovou teplotu, posléze krátce centrifugovali (2 minuty, 2000 g) a následně naředili do média na 70 nM koncentraci (2,10 µl LysoTracker® Deep Red do 30 ml média). Buňky jsme s LysoTracker® Deep Red inkubovali po dobu 30 minut a následně jsme médium vyměnili za čerstvé.

ER-Tracker™ Blue-White DPX jsme také nechali ohřát na pokojovou teplotu, krátce centrifugovali (2 minuty, 2000 g) a naředili do média na 100 nM koncentraci (4 µl ER-Tracker™ Blue-White DPX do 40 ml média). Buňky s ER-Tracker™ Blue-White DPX jsme inkubovali po dobu 15 minut a následně jsme médium vyměnili za čerstvé.

Hoechst 33342, který se používá k barvení buněčného jádra, jsme naředili v Dulbecco's PBS na výslednou koncentraci 1 µg/ml. Inkubovali jsme buňky spolu s Hoechst 33342 po dobu 20 minut, poté jsme PBS s Hoechst 33342 odsáli a k buňkám přidali čerstvé médium bez fluorescenční barvy.

Vždy po ukončení barvení jsme buňky bez prodlení měřili na konfokálním mikroskopu SP2 AOBS nebo SPE (© Leica Microsystems).

Excitační a emisní vlnové délky jednotlivých fluorescenčních sond:

- Glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 – excitace (ex.): 621 nm, emise (em.): 641 nm
- Glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolin) - ex.: 335 nm, em.: 500 nm
- Glykogen-POX-FITC a GG-FITC - ex.: 490 nm, em.: 525 nm

- LysoTracker® Deep Red - ex.: 647 nm, emise: 668 nm
- ER-Tracker™ Blue-White DPX- ex.: 374 nm, em.: 430 - 640 nm
- Hoechst 33342- excitace: 350 nm, emise: 461 nm

4.8. Inhibice internalizace

Princip metody

Klathrinem či kaveolinem zprostředkovaná endocytóza jsou na sobě nezávislé cesty endocytózy. Methyl- β -cyklodextrin (MBCD) je inhibitorem pro kaveolinem zprostředkovanou endocytózu, sacharóza pro klathrin dependentní endocytózu a cytochalasin D inhibuje oba typy endocytózy jako inhibitor polymerizace aktinu (Sahay et al. 2008).

Inkubujeme-li tedy buňky za přítomnosti konkrétního inhibitoru a značeného GG, měla by hodnota fluorescence média klesat pouze u vzorku bez inhibitoru. V přítomnosti inhibitoru by měl být pokles výrazně pomalejší nebo by k němu nemělo docházet vůbec.

Ideálně bychom měli dostat čtyři křivky hodnot fluorescence média v čase, kdy křivka hodnot fluorescence média pro vzorek bez inhibitoru, pouze se značeným GG, bude takřka totožná s jedním ze dvou inhibitorů (MBCD nebo sacharóza). Druhý typ inhibitoru (MBCD nebo sacharóza) by pak měl mít takřka identickou křivku hodnot fluorescence média s křivkou pro značený GG s cytochalasinem D.

Pracovní postup

Týden před experimentem jsme buňky přepasážovali do 24 jamkové destičky v ředění 1:4. Buňky jsme uložili do inkubátoru a po sedmi dnech jsme k nim přidali na půl hodiny inhibitory (1x cytochalasin D, 1x sacharóza, 1x MBCD a 1x bez inhibitoru). Koncentrace inhibitorů byly 0,25 mM pro cytochalasin D, 0,45 M pro sacharózu a 5 mM pro MBCD. Po půl hodině preinkubace jsme ze všech jamek, i těch, ke kterým jsme nepřidávali inhibitor, odsáli médium. Následně jsme přidali médium se značeným GG na výslednou koncentraci 0,3 %. Pokud jsme buňky

preinkubovali předchozí půl hodinu s jedním z inhibitorů, pak jsme stejný inhibitor ve stejné koncentraci přidali i k roztoku značeného GG. Následně jsme odebírali v předem určených časových intervalech vždy 200 μ l média od každého vzorku do 96 jamkové destičky a měřili hodnoty fluorescence média pomocí kombinovaného destičkového fotometru za použití band-pass filtrů, a to pro glykogen-graft-poly(2-methyl-2-oxazolin) s nižším obsahem polyoxazolinu excitační 320/20 nm a emisní 485/20 nm a pro glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 pak excitační 575/15 nm a emisní 620/40 nm. Jako blank jsme použili médium bez značeného glykogenu. Hodnotu senzitivity přístroje jsme nastavili na hodnotu 50 pro glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615, případně na hodnotu 80 pro glykogen-graft-poly(2-methyl-2-oxazolin) s nižším obsahem polyoxazolinu.

Pracovní postup jsme upravili podle publikované práce o internalizaci micelárních polymerů (Sahay et al. 2008) .

4.9.MTT test

Princip metody

Buňky jsou v exponenciální fázi vystaveny cytotoxické látce po určitou definovanou dobu. Následně je necháme projít několika cykly replikace, aby se odlišily buňky, které jsou, a které nejsou schopny růstu. Posléze je přidán žlutý MTT, který je živými buňkami, respektive mitochondriálními enzymy dýchacího řetězce, přeměněn na nerozpustný fialový MTT-formazan, jehož absorbanci lze po rozpuštění příslušnými detergenty změřit při 570 nm. Čím vyšší hodnoty absorbance dosahuje, tím vyšší je počet živých buněk, respektive jejich metabolická aktivita (Freshney 2000).

Pracovní postup:

HepG2 buňky staré 21 týdnů jsme trypsinizovali, přidali 4 ml média a přenesli do sterilní 15ml falkonky. Následně jsme buňky centrifugovali po dobu 5 minut při 1500 RPM. Po centrifugaci jsme opatrně odsáli médium a buňky resuspendovali v definovaném objemu (5 ml). Odebrali jsme 2 ml buněk a přenesli je do zkumavky k elektroporátoru Vi-Cell XR. Zjistili jsme

koncentraci buněk v 1 ml. Zbývající buňky jsme naředili do 10 ml média na výslednou koncentraci 18 000 buněk na 1 ml média. Buňky jsme přenesli do sterilní 50ml vaničky k vícekanálové pipetě. Do jamek sloupců 2-11 v řadách A-D 96 jamkové destičky jsme napipetovali vždy 200 μ l naředěné buněčné suspenze. Do jamek sloupců 1 a 12 v řadách A-D jsme napipetovali po 200 μ l čistého média. 96 jamkovou destičku jsme uložili do inkubátoru a nechali inkubovat po dobu 48 hodin. Po uplynutí této doby jsme naředili námi testovanou substancí (glykogen-FITC) na požadované koncentrace:

- navážka: 60 mg na 2 ml MEM w/o phenol red = 3% roztok
- Jamky 3A-D – 3%roztok
- Jamky 4A-D – 0,6%roztok
- Jamky 5A-D – 0,12%roztok
- Jamky 6A-D – 0,024%roztok
- Jamky 7A-D – 0,0048%roztok
- Jamky 8A-D – 0,00096%roztok
- Jamky 9A-D – 0,000192%roztok
- Jamky 10A-D – 0,0000384%roztok

V jamkách 2A-D a 11A-D jsme pouze vyměnili médium za čerstvé médium bez glykogenu-FITC. Buňky jsme uložili do inkubátoru a inkubovali s glykogenem-FITC po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby jsme v jamkách sloupců 2-11 v řadách A-D vyměnili médium za nové a buňky uložili do inkubátoru. Následně jsme připravili glycinový pufr - 0,1 M NaCl s 0,1 M glycinem, pH 10,5.

Po uplynutí 4 PDTs (*population doubling times*, čas zdvojení populace - u HepG2 buněčné linie odpovídá 24 hodinám) jsme k buňkám ve sloupcích 1-11 a řadách A-D přidali 50 μ l roztoku MTT v médiu o koncentraci 50 mg/ml (celkem 3 ml). Tento roztok jsme před pipetováním přenesli do 50ml vaničky k multikanálové pipetě. Následně jsme přidali ještě 200 μ l čistého média, které jsme taktéž přenesli do 50ml vaničky k multikanálové pipetě. 96 jamkovou destičku jsme zabalili do aluminiové folie a uložili do inkubátoru na pět hodin. Po uplynutí této doby jsme z jamek ve sloupcích

1-11 řad A-D odsáli médium s MTT a přidali vždy po 200 µl DMSO a 25 µl glycinového pufru. Bez prodlení jsme měřili absorbanci při 570 nm na kombinovaném destičkovém fotometru.

4.10. *In vivo* fluorescence

Princip metody

In vivo fluorescence je neinvazivní metoda sledování biodistribuce fluorescenčně značené látky v organismu. Fluorescenční sonda by měla mít excitační i emisní spektrum v červené či NIR oblasti kvůli propustnosti a omezení autofluorescence tkání. Přístroj IVIS® Lumina XR umožňuje sledovat tuto fluorescenčně značenou látku *in vivo* v reálném čase po její aplikaci do živého zvířete a lze tedy určit biodistribuci této látky v organismu. Také nám poskytne informace o hlavních cestách exkrece fluorescenční značky z organismu, či zda není námi podaná látka vychytávána retikuloendotelovým systémem (zjistíme vypreparováním sleziny a jater a změřením jejich hodnot fluorescence).

Pracovní postup

Tři samice kmene CD1-Nude staré 3 týdny byly ponechány dva týdny ve zvěřinci kvůli aklimatizaci na nové prostředí. Po uplynutí této doby jsme jim 24 hodin před pokusem odebrali potravu, jejíž přítomnost v trávicím traktu může způsobit autofluorescenci.

Připravili jsme roztok glykogenu-DOTA Gd-Dyomics 615 (55 mg glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 na 1,5 ml fyziologického roztoku). Pokusným zvířatům jsme aplikovali vždy 200 µl daného roztoku. Myši jsme nejdříve nahřáli pod lampou kvůli vasodilataci cév. Následně jsme je bez anestézie přenesli do aplikační komůrky, kde probíhala aplikace do ocasní žíly. První i.v. aplikaci roztoku glykogenu-DOTA Gd-Dyomics 615 do ocasní žíly jsme provedli v půl desáté ráno. Druhé myši jsme aplikovali do podkoží v oblasti břicha v deset hodin dopoledne, tuto aplikaci jsme provedli mimo aplikační komůrku a bez předchozího nahřání pro vasodilataci. Poslední myši jsme i.v. aplikovali do ocasní žíly ve čtvrt na jedenáct. Všechna

pokusná zvířata jsme ihned po aplikaci uspali pomocí 2% isofluranu a přenesli do biotonického zobrazovacího systému IVIS® Lumina XR, kde jsme prováděli snímání. Po ukončení snímání jsme první myš usmrtili zlomením vazů a vyoperovali jsme jí vnitřní orgány (játra, slezina, střevo, ledviny, močové cesty a močový měchýř), které jsme následně nasníмали pro bližší určení míry fluorescence v jednotlivých orgánech.

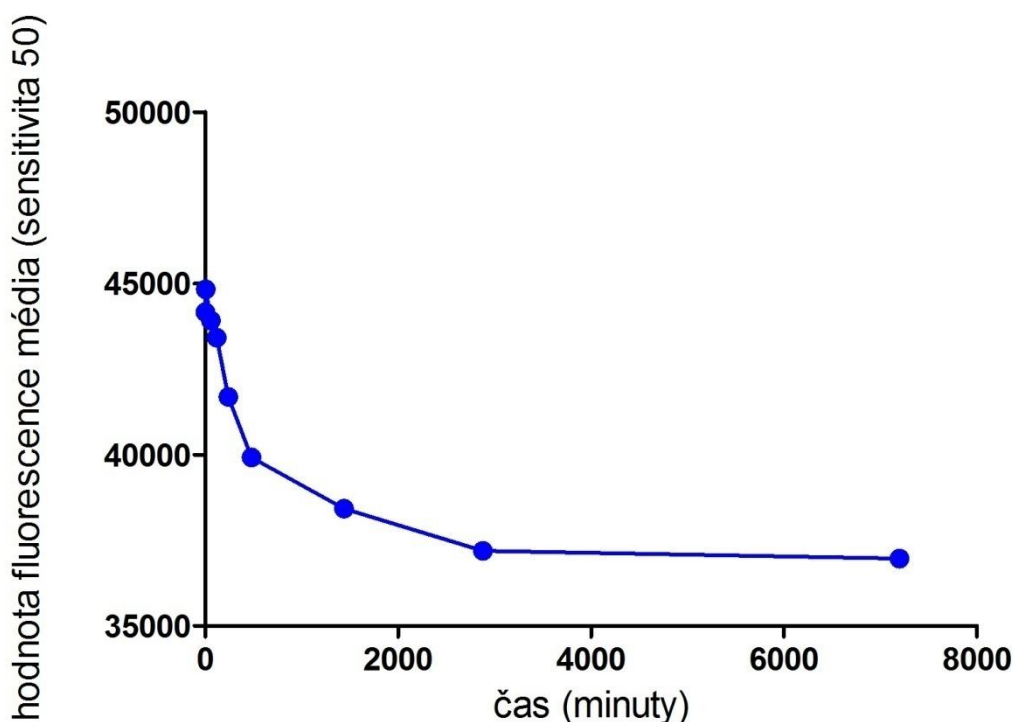
Aplikaci do ocasní žíly prováděla MUDr. Jana Mattová, technickou pomoc poskytl Mgr. Ondřej Lukšan.

5. Výsledky

5.1. Průběh vychytávání značeného glykogenu z média HepG2 buněčnou linií

Po primárním určení optimální koncentrace značeného glykogenu pro měření hodnot fluorescence na kombinovaném destičkovém fotometru a dalších chemických analýzách vzorků jsme měřili časový průběh vychytávání značeného glykogenu z média buněčnou linií HepG2. Odběry média se značeným glykogenem (glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615, glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolin) - dva vzorky, jeden s nižším obsahem polyoxazolinu, druhý s vyšším obsahem) byly prováděny po dobu 48 hodin v předem určených časových intervalech.

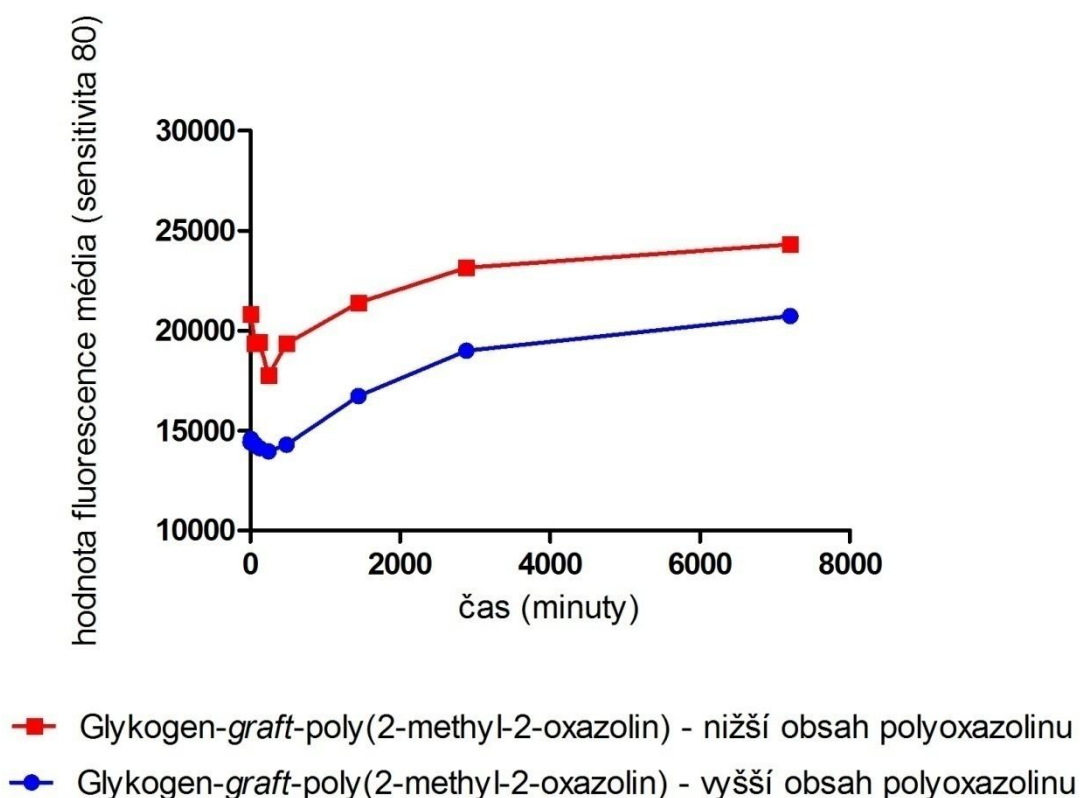
Z průběhu křivek vychytávání značeného GG je patrné, že v případě glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 se fluorescenční značka spolu s glykogenem dostává do buněk, kde je značka zadržována a již neodchází zpět do média, tzn. fluorescence média kontinuálně klesá (Obr. 6).



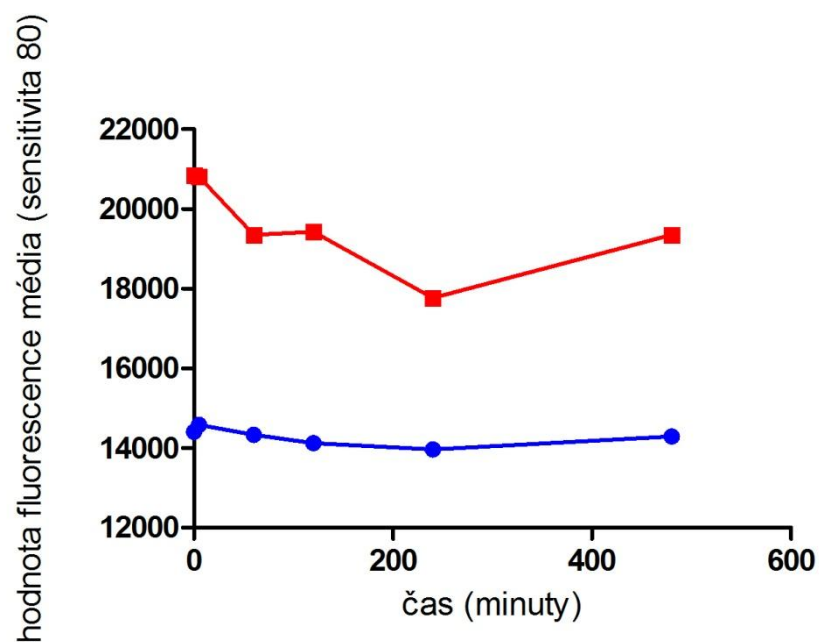
Obrázek 6: Časový průběh vychytávání glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 z média buněčnou linií HepG2.

V případě obou typů glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinu) je situace poněkud odlišná (Obr. 7). Koncentrace fluorescenční značky nejprve po dobu prvních 4 - 8 hodin v médiu klesá a posléze opět do média exocytózou z buněk HepG2 vstupuje, proto se hodnota fluorescence dostává nad hodnotu iniciální (po několika odběrech se snížil objem inkubačního média, fluorescenční značka se tedy dostává do menšího objemu).

Mezi dvěma variantami glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinu) také můžeme z časových průběhů vychytávání fluorescenční značky vyčíst předpokládaný rozdíl v intenzitě tohoto vychytávání daný chemickou mírou modifikace nativního glykogenu (Obr. 8).



Obrázek 7: Časový průběh vychytávání glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinu) z média buněčnou linií HepG2.

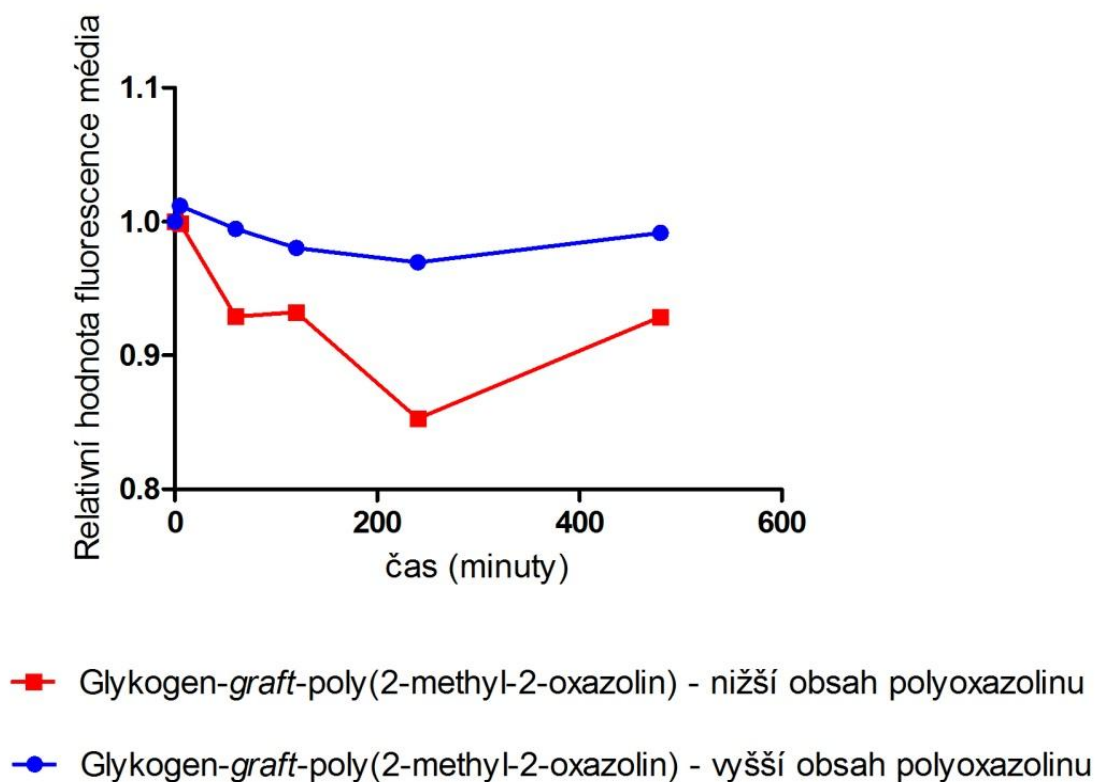


— Glykogen-graft-poly(2-methyl-2-oxazolin) - nižší obsah polyoxazolinu

— Glykogen-graft-poly(2-methyl-2-oxazolin) - vyšší obsah polyoxazolinu

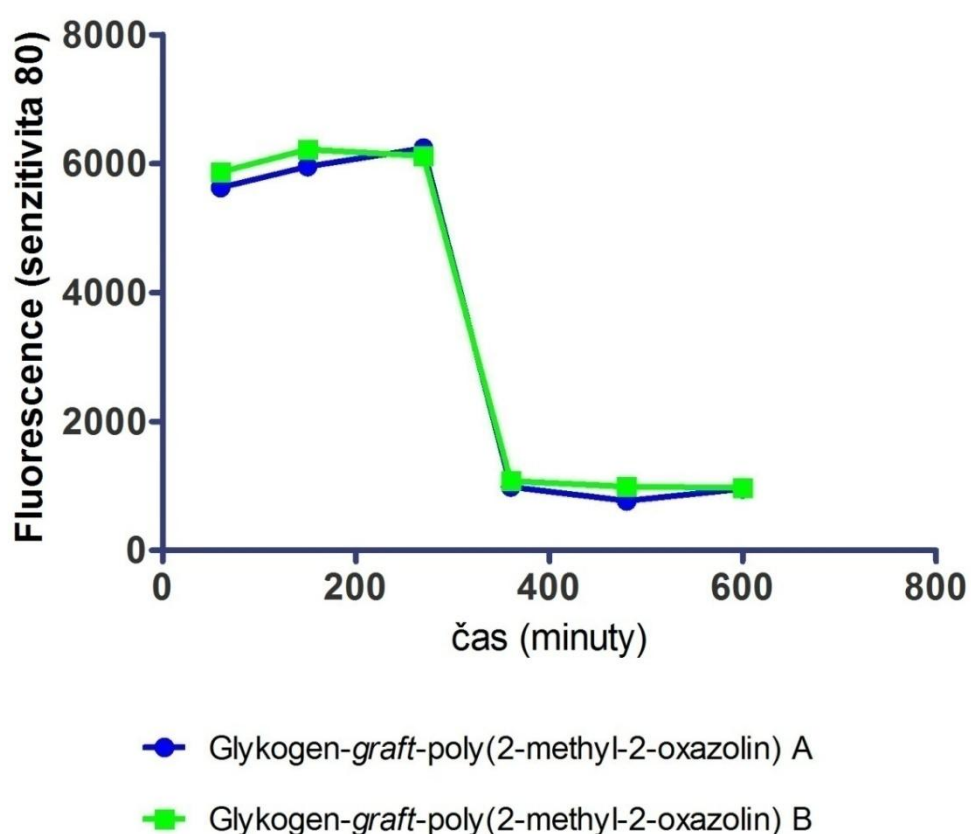
Obrázek 8: Časový průběh vychytávání glykogen-graft-poly(2-methyl-2-oxazolinu) z média buněčnou linií HepG2. Křivka pro prvních 8 hodin pro lepší ilustraci rozdílů mezi dvěma variantami glykogen-graft-poly(2-methyl-2-oxazolinu).

V případě glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinu) s nižším obsahem polyoxazolinu klesla po 240 minutách fluorescence o 15 %. U glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinu) s vyšším obsahem polyoxazolinu pouze o 3 % (Obr. 9).



Obrázek 9: Pokles relativních hodnot fluorescence média s glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolin) pro prvních 480 minut měření.

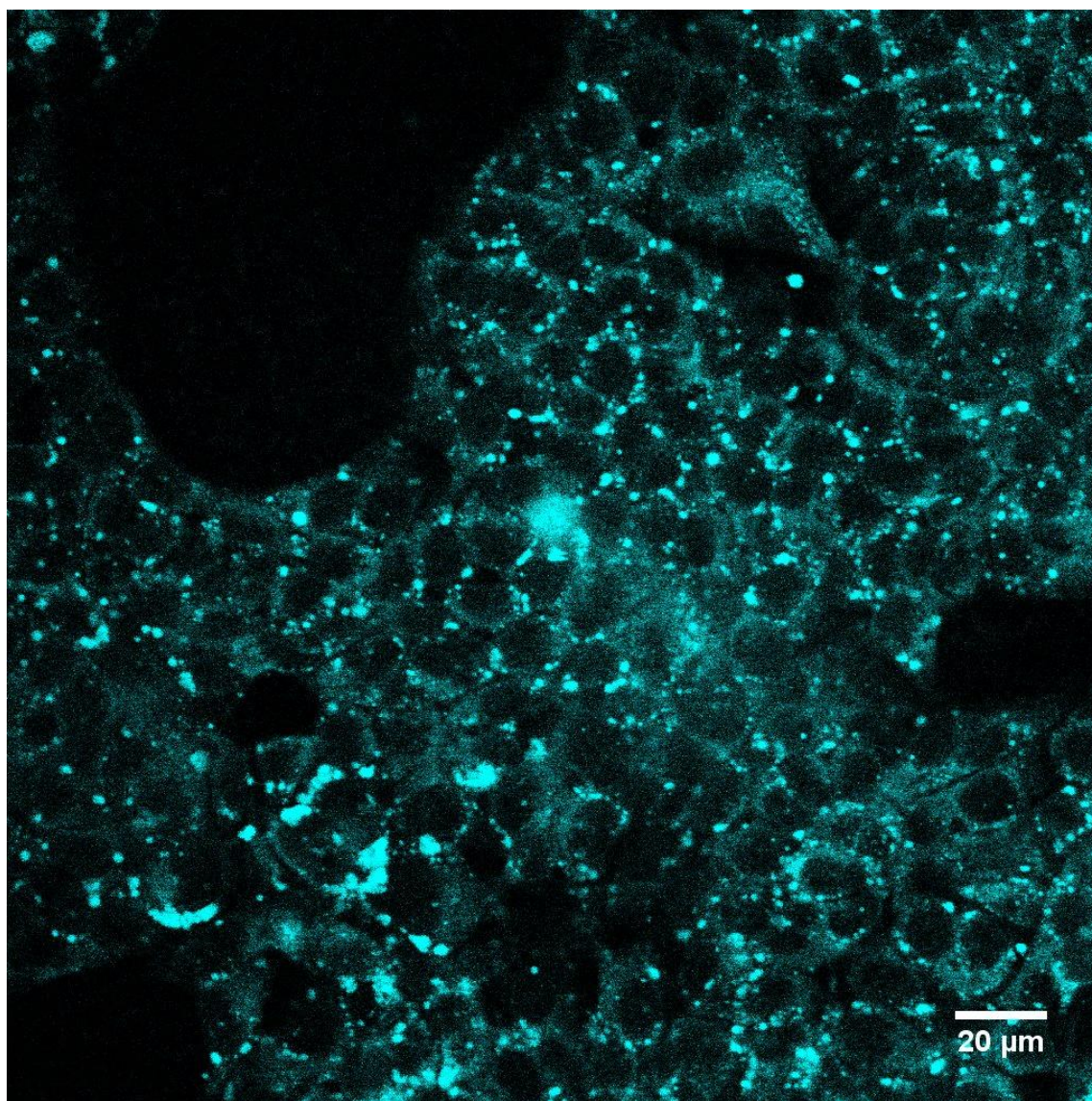
Pokud bylo médium s glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinem) s vyšším obsahem polyoxazolinu po 270 minutách inkubace odstraněno a nahrazeno médiem bez značeného GG nedocházelo v průběhu dalších 330 minut k vzrůstu fluorescence média (Obr. 10).



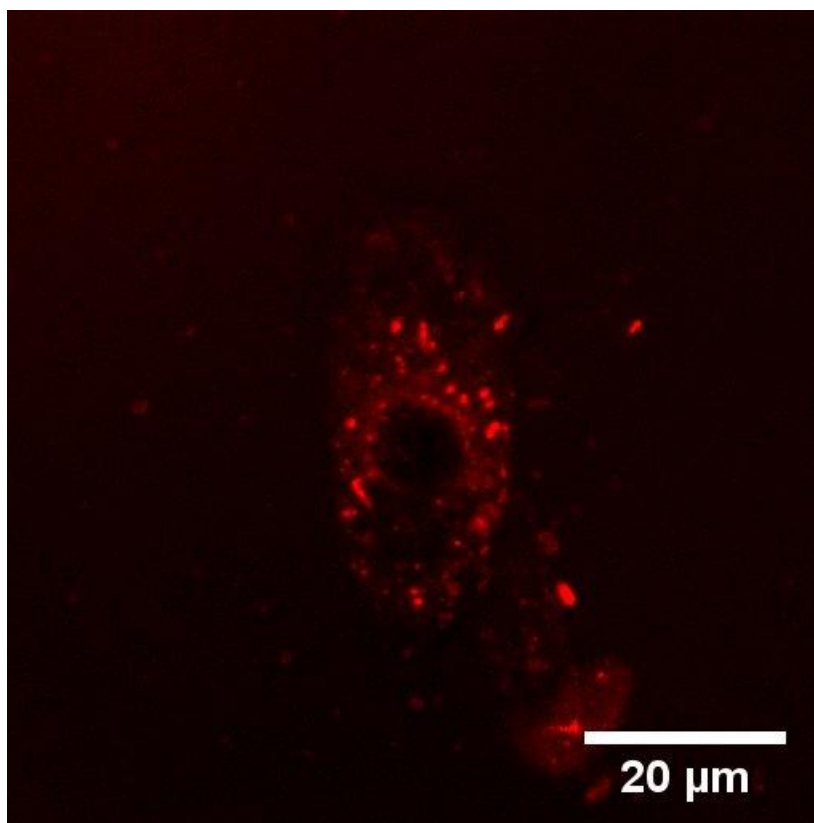
Obrázek 10: Časový průběh změn hodnot fluorescence média po přidání média se značeným GG k HepG2 buňkám a následné výměně za čisté médium ve 360 minutě. Do média byl přidán glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolin) s nižším obsahem oxazolinu. Pro vzorek A a B byla použita stejná šarže značeného GG.

5.2. Hodnocení intracelulární lokalizace pomocí konfokální mikroskopie

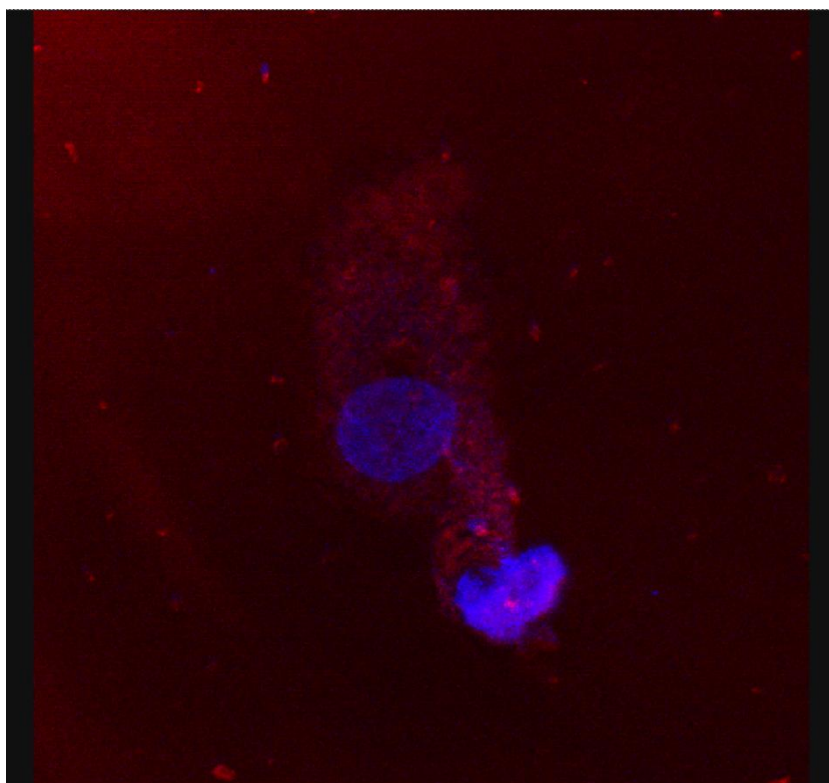
Z výsledků získaných pomocí konfokální mikroskopie můžeme konstatovat, že se externě podaný glykogen lokalizuje v cytoplazmě (Obr. 11) a neprochází do jádra buněk HepG2 (Obr. 11, Obr. 12, Obr. 13).



Obrázek 11: Glykogen-graft-poly(2-methyl-2-oxazolin) s nižším obsahem polyoxazolinu v HepG2 buňkách.

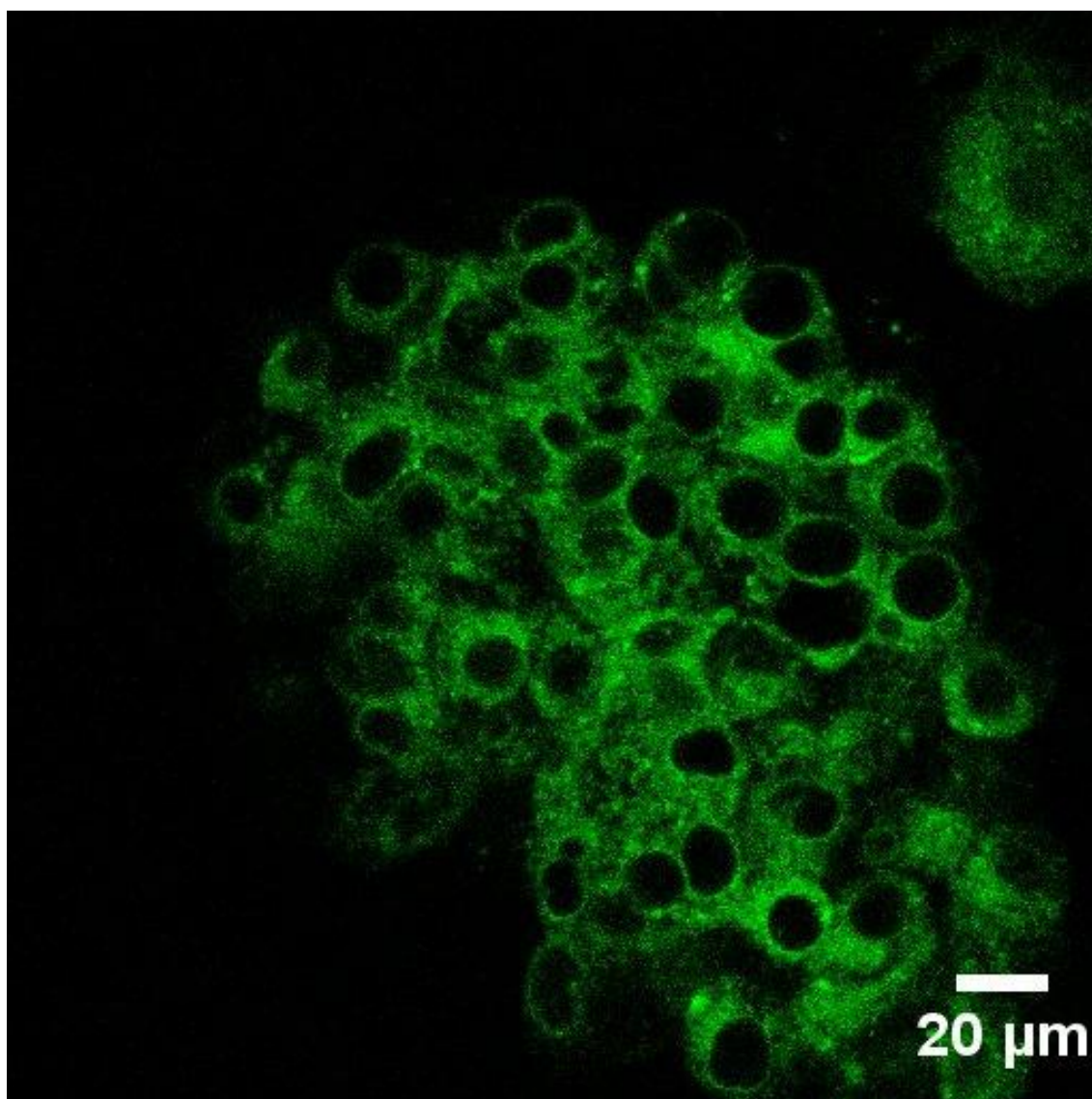


Obrázek 12: Glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 v buněčné linii HepG2.

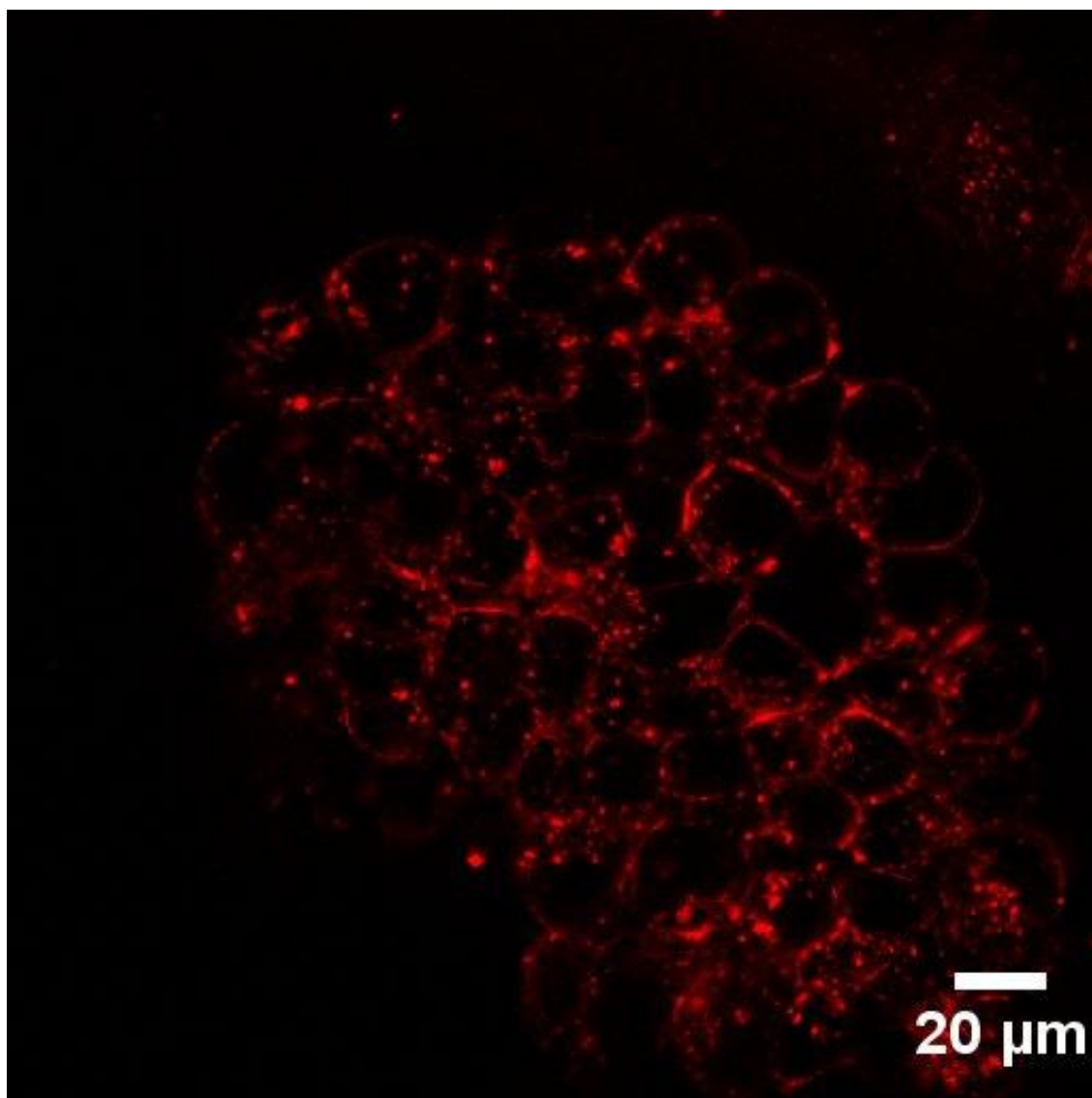


Obrázek 13: Glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 (červený fluorescenční signál) spolu s Hoechst 33342 (modrý fluorescenční signál) u buněčné linie HepG2.

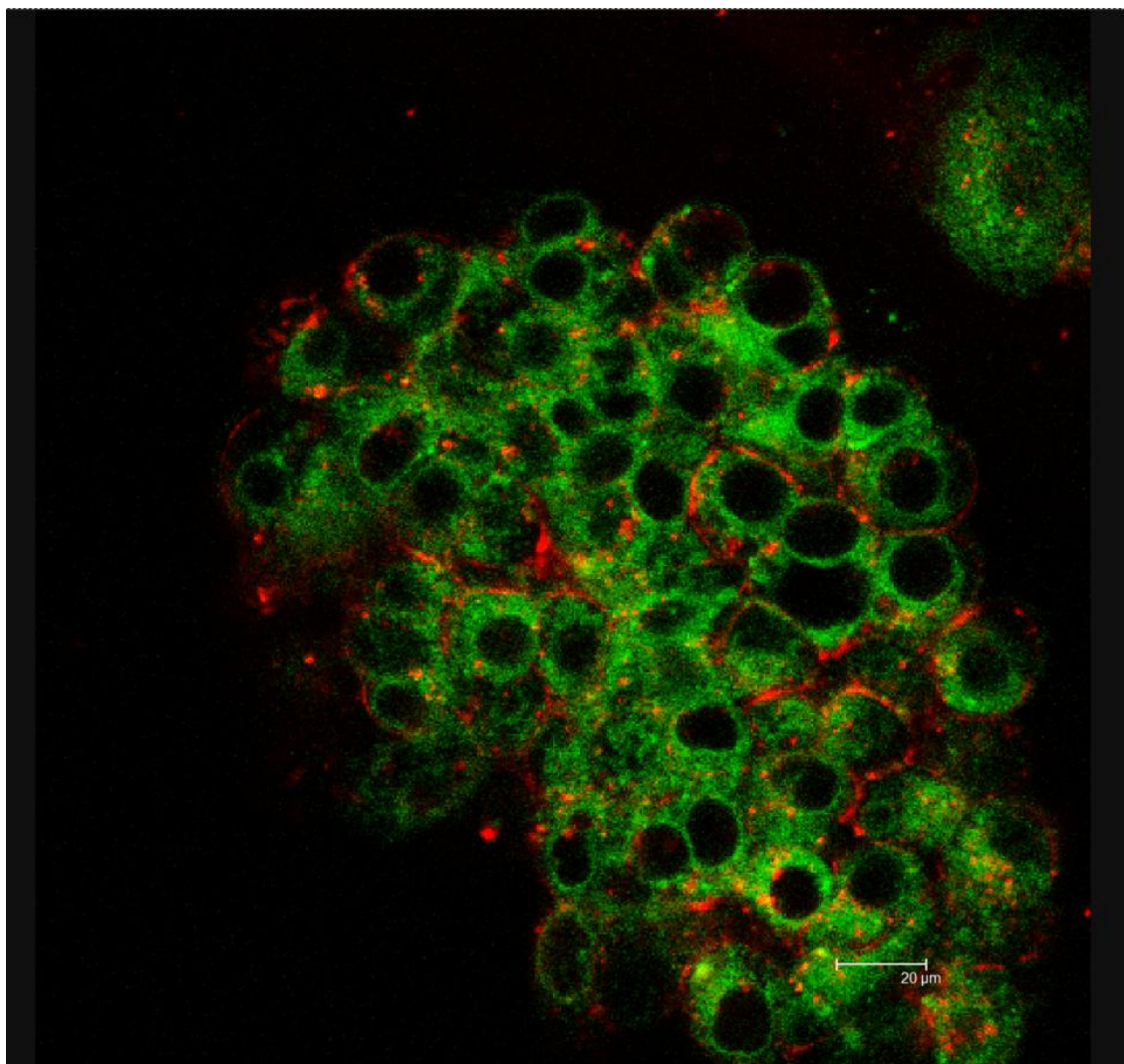
Na dalších snímcích můžeme vidět HepG2 buňky fluorescenčně barvené pomocí ER-Tracker™ Blue-White DPX a glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 (Obr. 14 - 16). Dle snímků lze tvrdit, že značený externě podaný glykogen nekolokalizuje (neasociuje) s endoplazmatickým retikulem.



Obrázek 14: HepG2 buňky fluorescenčně značené glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 a ER-Tracker™Blue-White DPX.
Zobrazen fluorescenční signál pro ER-Tracker™ Blue-White DPX.

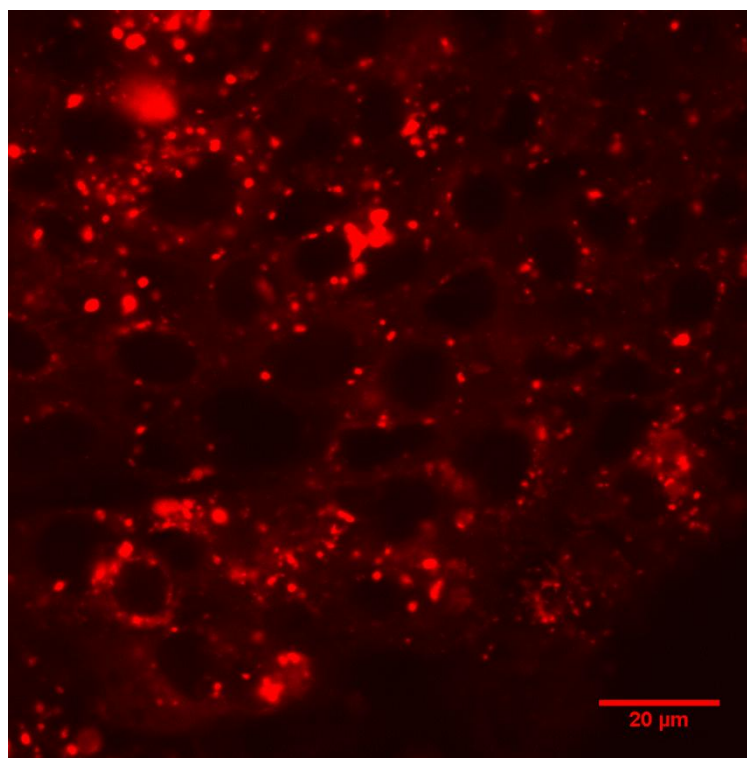


Obrázek 15: HepG2 buňky fluorescenčně značené glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 a ER-Tracker™ Blue-White DPX.
Zobrazen fluoresceční signál pro glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615.

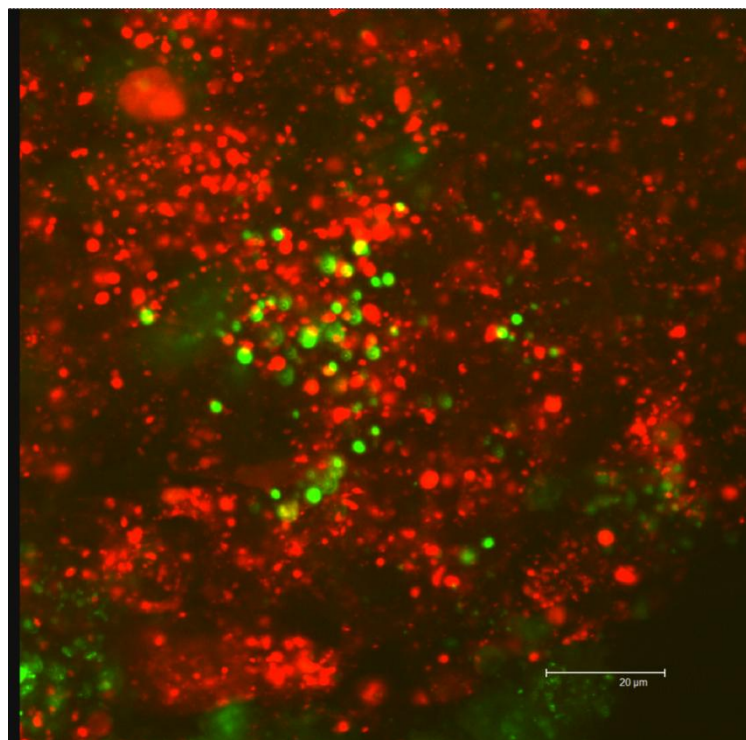


Obrázek 16: HepG2 buňky fluorescenčně značené glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 a ER-Tracker™ Blue-White DPX.
Softwarové proložení obrázků 14 a 15.

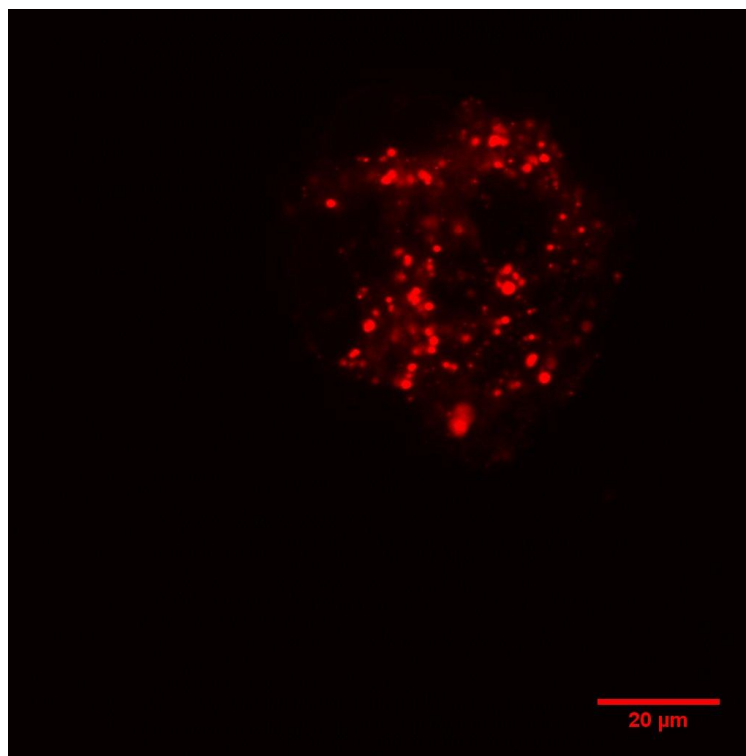
Snímky HepG2 buněčné linie barvené pomocí fluorescenční sondy pro lysozomy LysoTracker® Deep Red (červený fluorescenční signál) v kombinaci s glykogen-POX-FITC (Obr. 17 a 18) nebo glykogen-FITC (Obr. 19 - 21), neprokazují kolokalizaci značeného GG s lysozomy. Značenému GG s navázaným FITC odpovídá zelený fluorescenční signál.



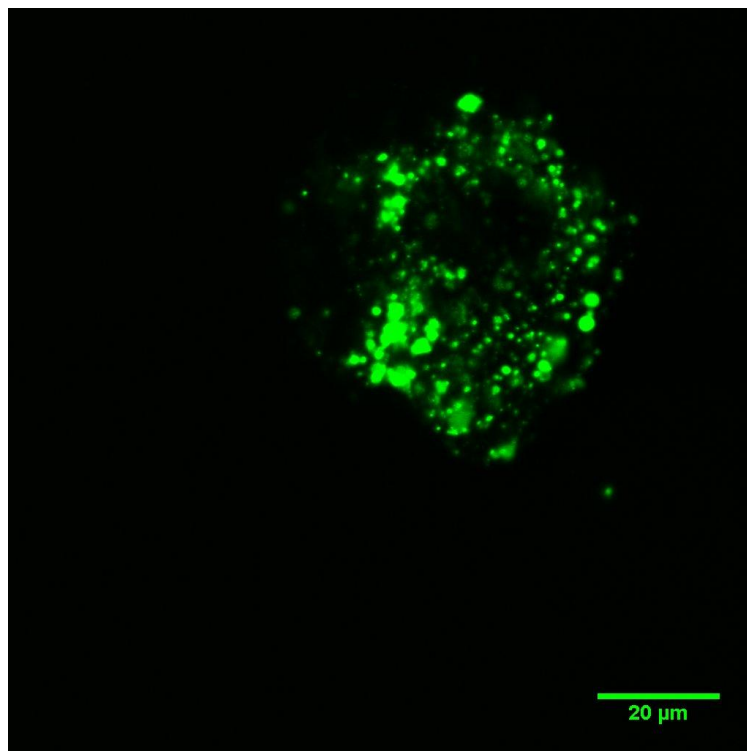
Obrázek 17: HepG2 buňky barvené LysoTracker® Deep Red a glykogen-POX-FITC.
Zobrazen fluorescenční signál pro LysoTracker® Deep Red.



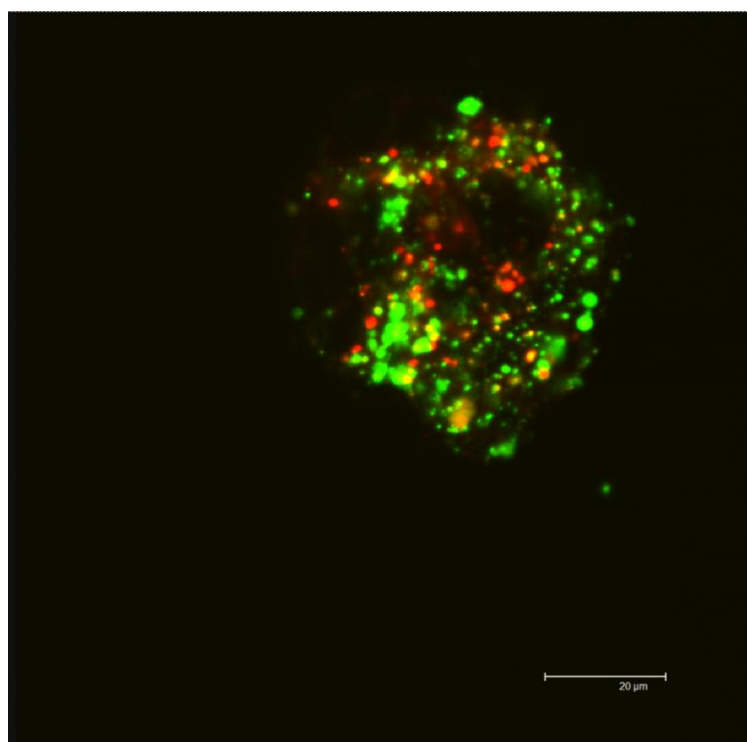
Obrázek 18: HepG2 buňky barvené LysoTracker® Deep Red a glykogen-POX-FITC.
Softwarové proložení fluorescenčních signálů LysoTracker® Deep Red (červená) a FITC (zelená).



Obrázek 19: HepG2 buňky barvené LysoTracker® Deep Red a glykogen-FITC.
Zobrazen fluorescenční signál pro LysoTracker® Deep Red.



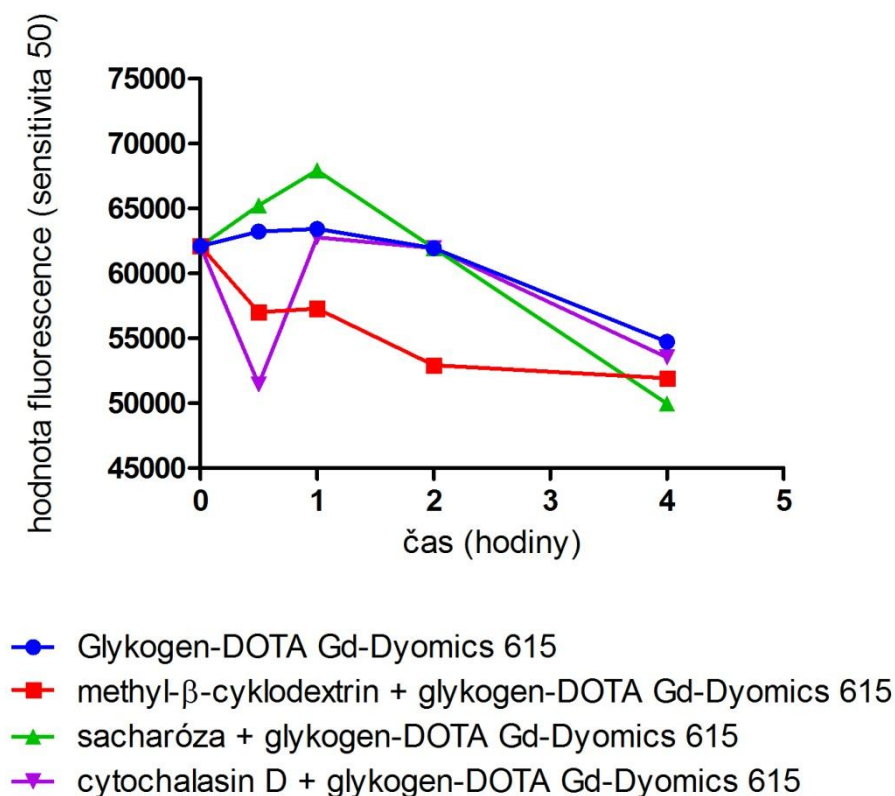
Obrázek 21: HepG2 buňky barvené LysoTracker® Deep Red a glykogen-FITC.
Zobrazen fluorescenční signál pro glykogen-FITC.



Obrázek 20: HepG2 buňky barvené LysoTracker® Deep Red a glykogen-FITC.
Softwarové proložení fluorescenčních signálů LysoTracker® Deep Red (červená) a FITC (zelená).

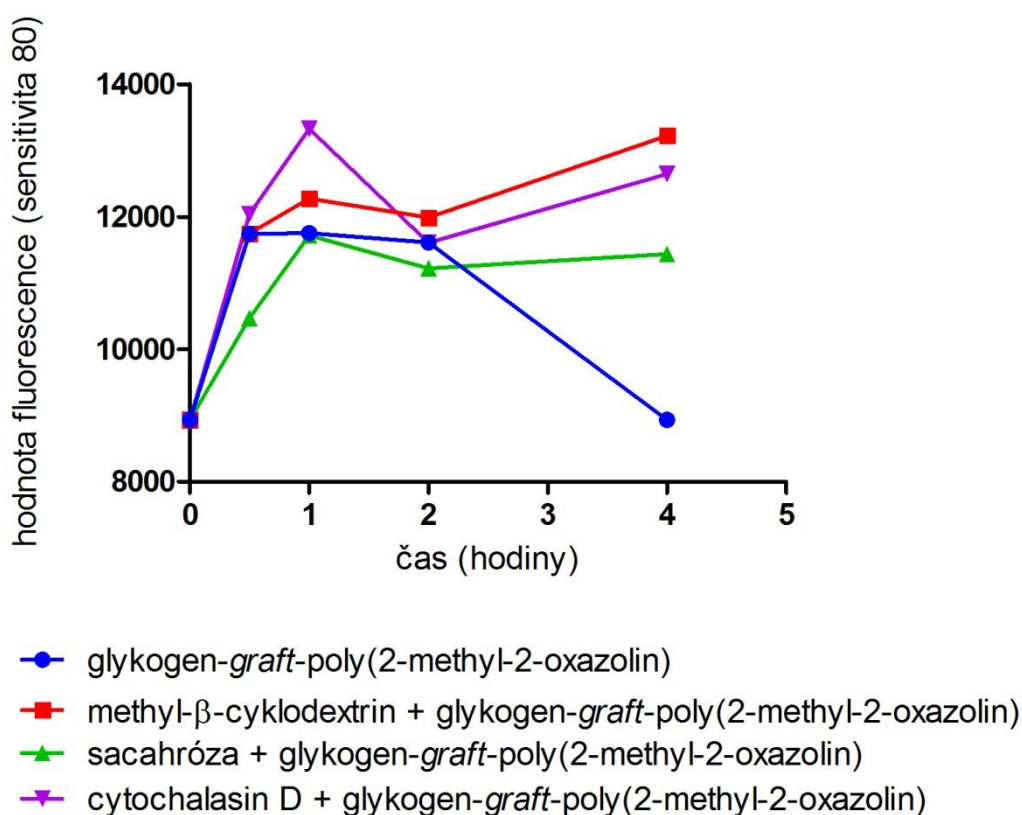
5.3. Určení způsobu internalizace externě podaného glykogenu

Hodnoty fluorescence média s glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 se po přidání inhibitorů ani v jednom případě (MBCD, sacharóza, cytochalasin D) výrazně nelišili od hodnot fluorescence média bez inhibitoru jen s glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615. Po 4 hodinách inkubace byly hodnoty fluorescence média na podobné úrovni (Obr. 22).



Obrázek 22: Časový průběh vychytávání glykogenu-DOTA Gd-Dyomics 615 po přidání inhibitorů.

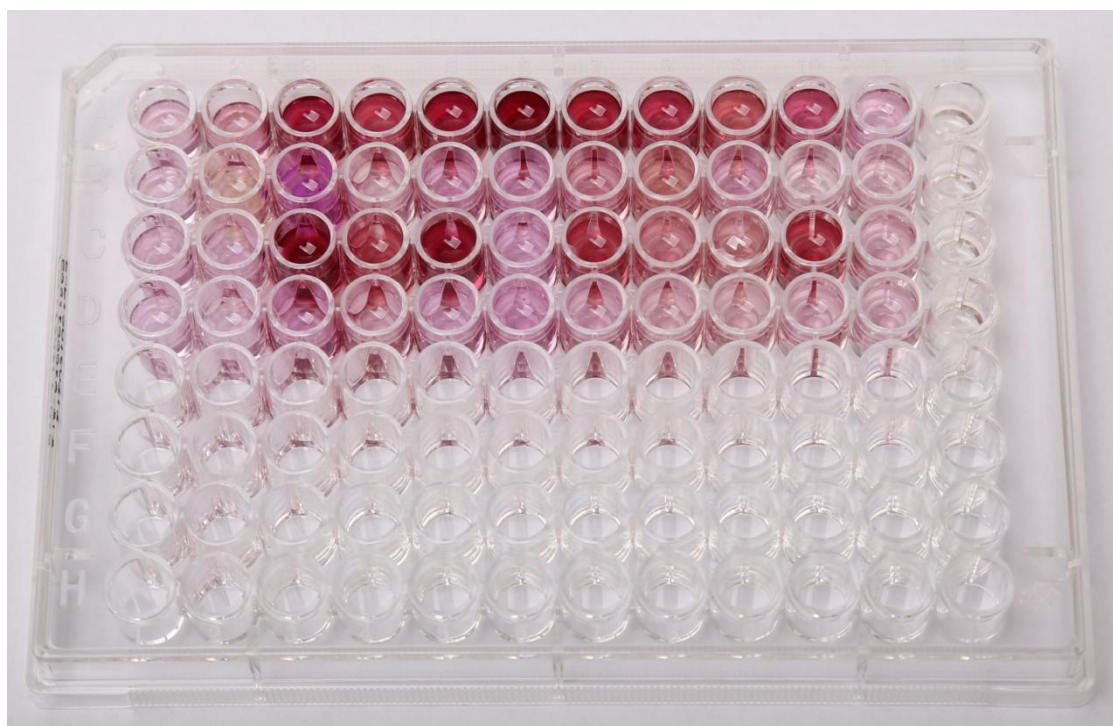
Po 4 hodinách inkubace s glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinem) s nižším obsahem polyoxazolinu a inhibitory byl pozorován méně výrazný rozdíl mezi hodnotou fluorescence média se samotným glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinem) s nižším obsahem polyoxazolinu a hodnotou fluorescence média, u kterého byla ke glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolin) s nižším obsahem polyoxazolinu přidána sacharóza jako inhibitor, než v případě dvou dalších inhibitorů (MBCD a cytochalasin D), kde byl tento rozdíl výraznější (Obr. 23).



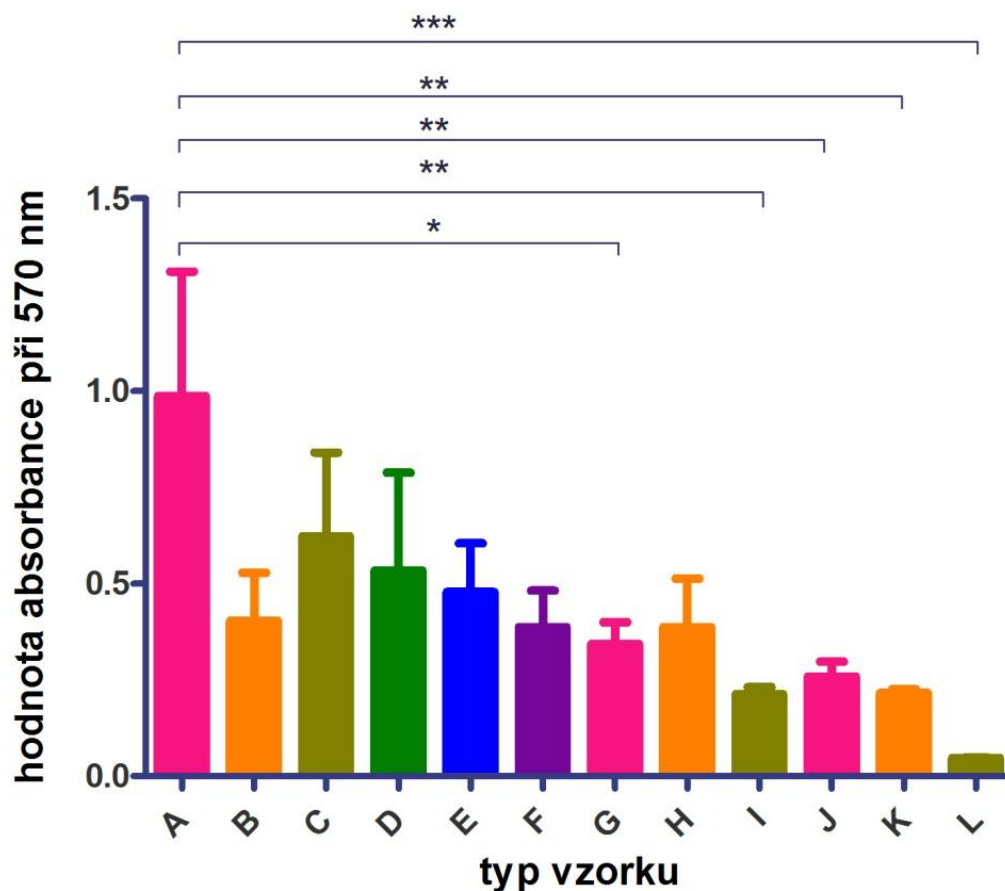
Obrázek 23: Časový průběh vychytávání glykogenu-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinu) po přidání inhibitorů.

5.4.MTT test cytotoxicity

Fyzickou podobu výsledku testu cytotoxicity můžeme vidět na Obr. 24. Cytotoxický efekt, který jsme stanovovali pomocí MTT testu, nebyl prokázán ani u nejvyšší 3% koncentrace glykogenu-FITC, buňky naopak vykazovaly nejvyšší viabilitu. Významný rozdíl v hodnotách absorbance při 570 nm byl prokázán mezi buňkami, které byly vystaveny působení 3% roztoku glykogenu-FITC a kontrolami (HepG2 buňky, které nebyly vystaveny působení glykogenu-FITC). Dále také mezi buňkami, které byly vystaveny působení 3% roztoku glykogenu-FITC a blankem (jamka byla vystavena působení MTT, ale neobsahovala HepG2 buňky). Potom též mezi buňkami, které byly vystaveny působení 3% roztoku glykogenu-FITC a buňkami, které byly vystaveny působení 0,000192% roztoku glykogenu-FITC. Pokles hodnoty absorbance oproti trendu u 0,6% koncentrace glykogenu-FITC je s největší pravděpodobností způsoben menším počtem buněk v daných jamkách z důvodu chybné funkce 12-kanálové pipety (Obr. 25).



Obrázek 24: 96-jamková destička s výsledky testu cytotoxicity pomocí MTT.



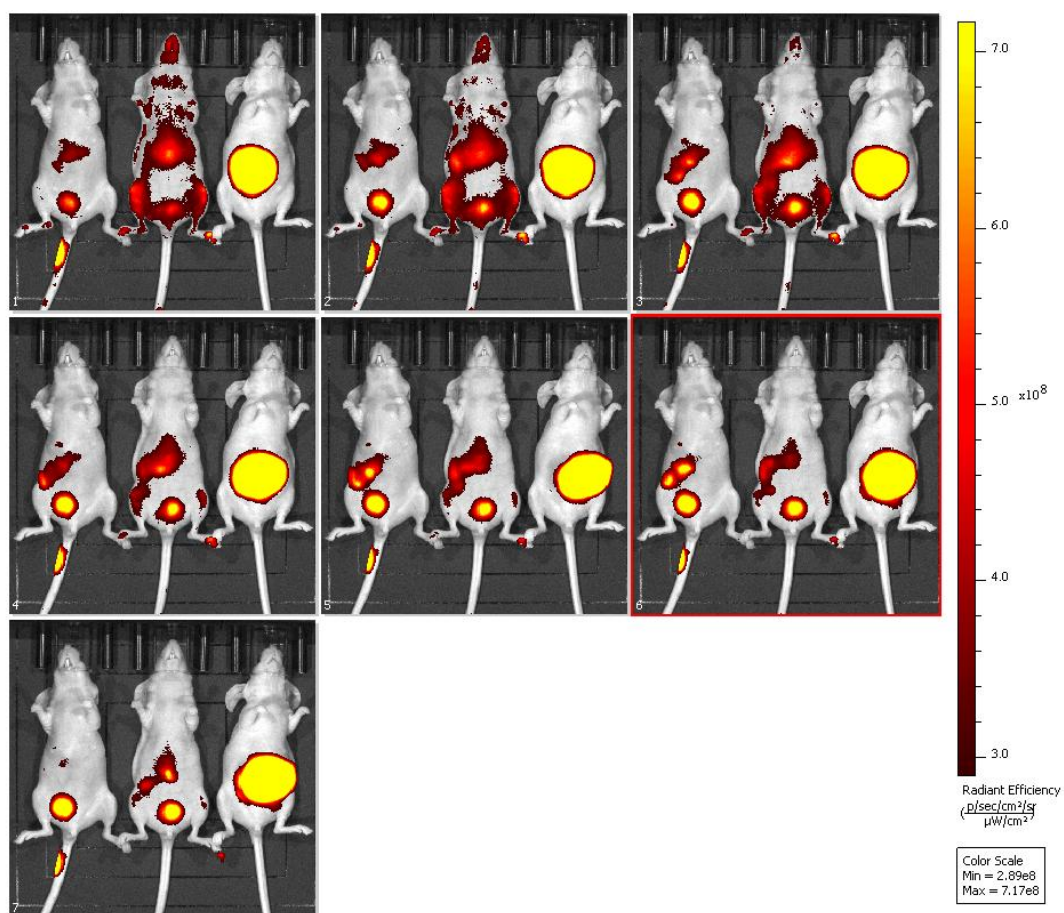
Obrázek 25: Výsledky testu cytotoxicity pomocí MTT pro glykogen-FITC.

Vzorky - **A:** buňky vystavené 3% koncentraci glykogen-FITC, **B:** buňky vystavené 0,6% koncentraci glykogen-FITC, **C:** buňky vystavené 0,12% koncentraci glykogen-FITC, **D:** buňky vystavené 0,024% koncentraci glykogen-FITC, **E:** buňky vystavené 0,0048% koncentraci glykogen-FITC, **F:** buňky vystavené 0,00096% koncentraci glykogen-FITC, **G:** buňky vystavené 0,000192% koncentraci glykogen-FITC, **H:** buňky vystavené 0,0000384% koncentraci glykogen-FITC, **I:** vzorky bez buněk, pouze s médiem a MTT, **J** a **K:** vzorky s HepG2, které nebyly vystaveny působení značeného GG, ale bylo k nim přidáno MTT, **L:** pouze čisté médium. Statistické hodnocení bylo prováděno pomocí dvoucestné ANOVY, statisticky významný rozdíl byl nalezen mezi vzorky A a G ($\alpha=0,05$), dále mezi A a I, J, K (vždy $\alpha=0,01$), také mezi A a L ($\alpha=0,001$).

5.5. *In vivo* lokalizace

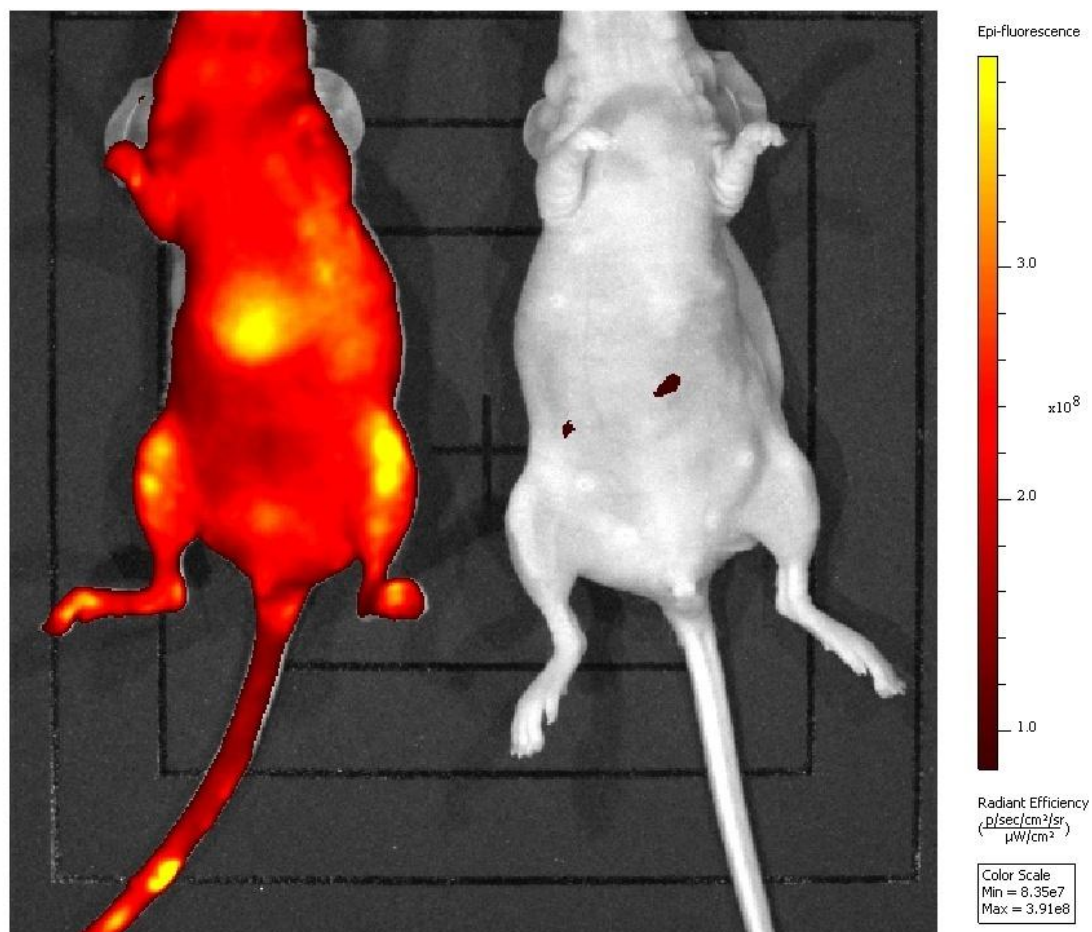
Z výsledků pokusů *in vivo* na zdravých (bez nádoru) myších kmene CD1-Nude lze usuzovat na průběh biodistribuce, transportu a lokalizace v tkáních externě podaného (intravenózně - i.v., respektive subkutánně - s.c.) glykogenu-DOTA Gd-Dyomics 615.

Aplikace roztoku značeného glykogenu byla provedena u třech myších samic kmene CD1-Nude, stáří 5 týdnů (v době pokusu). Ze snímků časové řady lze uzavřít, že biodistribuce a konečný způsob eliminace se až na časový posun daný rozdílným časem aplikace u i.v. podání do ocasní žíly výrazně neliší. Po 4 hodinách od i.v. aplikace do ocasní žíly je prakticky veškerý fluorescenční signál detekovatelný pouze z močového měchýře, kde se akumuluje fluorescenční značka Dyomics 615. Po s.c. aplikaci v břišní oblasti se vytvořilo depo značeného GG, které se po dobu sledování v podstatě neměnilo (Obr. 26).



Obrázek 26: Série sedmi obrázků biodistribuce glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615. Sedm snímků po půlhodině (10:30 - 13:30). Vlevo na snímcích myš, které se aplikoval značený GG i.v. do ocasní žíly jako první (9:30), uprostřed myš, které se aplikoval značený GG i.v. do ocasní žíly jako poslední (10:15), vpravo myš, které se aplikovalo jako druhé (10:00), nicméně aplikace byla s.c. v oblasti břicha.

Myš, které jsme aplikovali roztok glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 jako první vykazuje výraznou hodnotu *in vivo* fluorescence. Myš, u které aplikace ještě neproběhla, vykazuje prakticky nulovou hodnotu fluorescence (Obr. 27). Tento výsledek nám umožňuje konstatovat, že pozorované hodnoty fluorescence jsou skutečně způsobené aplikací značeného GG.

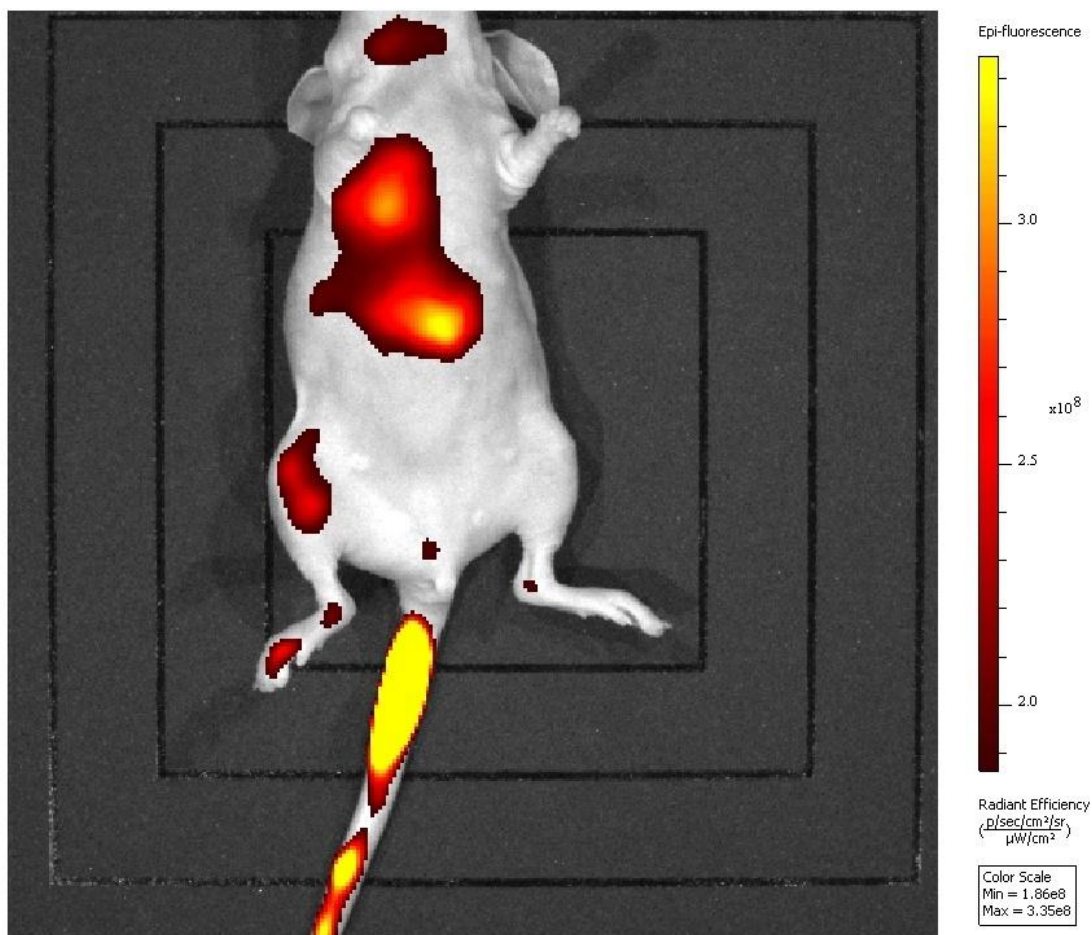


Obrázek 27: Srovnání *in vivo* fluorescence před a po aplikaci glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615.

První myši 35 minut po i.v.aplikaci Glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 (vlevo) a myš, u které aplikace ještě neproběhla (vpravo).

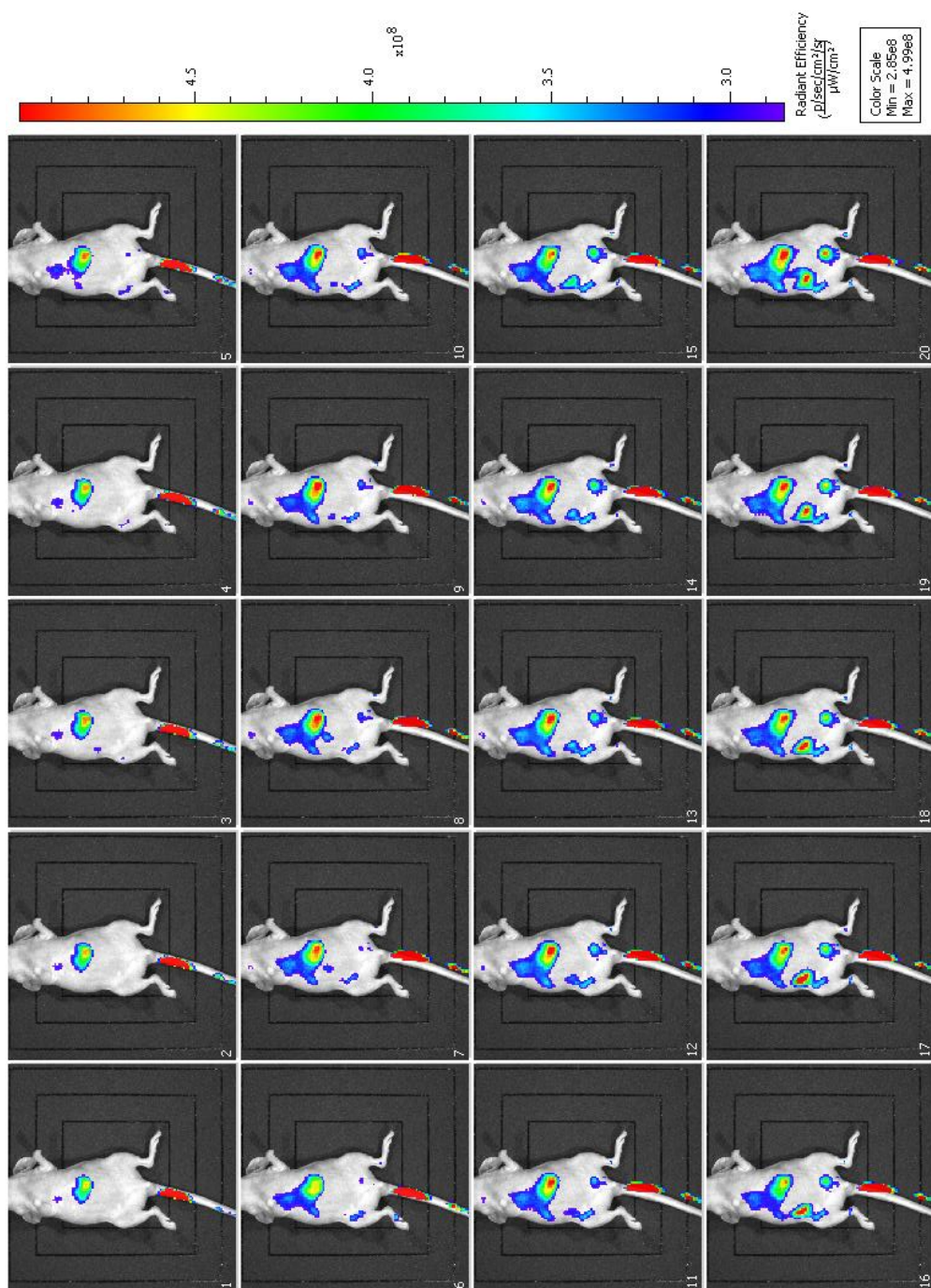
Obr. 28 - Obr. 35 zachycují pouze jediné pokusné zvíře a to myš, které se aplikoval glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615, jako první v čase 9:30.

Na Obr. 28 je zachycena myš CD1-Nude tři minuty od i.v. aplikace roztoku glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 i.v. do ocasní žíly.



Obrázek 28: První myš 3 minuty po i.v.aplikaci glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 do ocasní žíly.

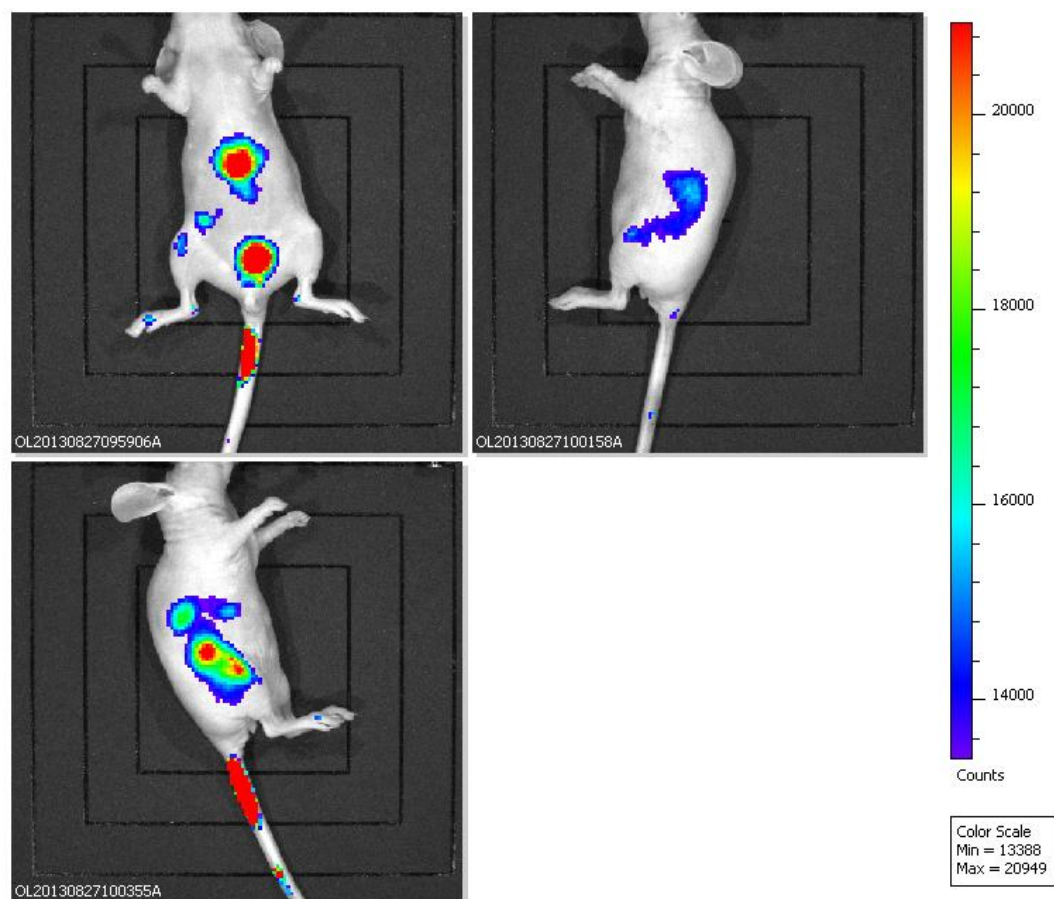
Série snímků z 5. - 24. minuty od i.v. aplikace glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 do ocasní žíly u první myši ukazuje, že nejsilnější fluorescenční signál se postupně přesouvá z jater do močového měchýře (Obr. 29).



Obrázek 29: Série 20 snímků v časových intervalech jedné minuty první myši po i.v. aplikaci glykogen DOTA Gd-Dyomics 615.

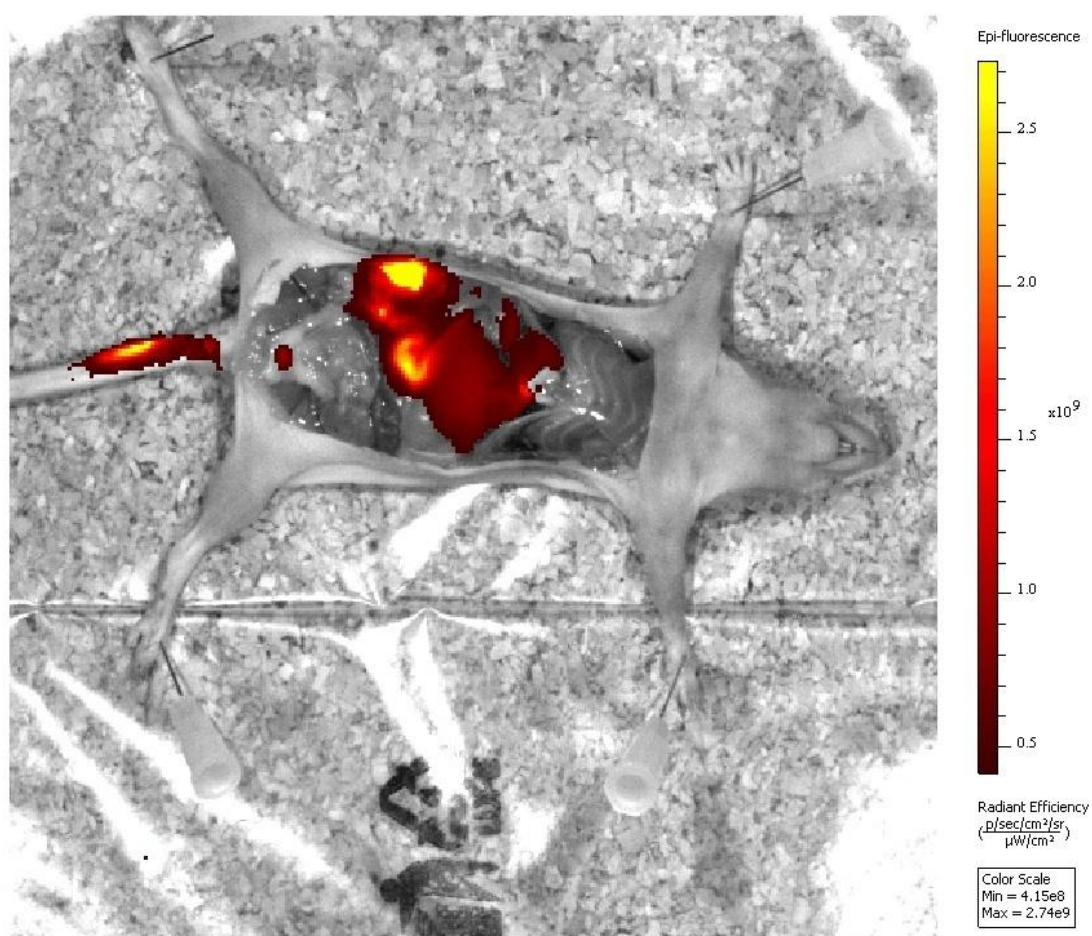
První snímek z 5. minuty po aplikaci. Můžeme vidět fluorescenční signál v játrech, fluorescenční signál se postupně přesouvá i do močového měchýře.

Snímky tří různých poloh první myši 30 minut po i.v. aplikaci značeného GG do ocasní žíly opět prokazují fluorescenční signál v játrech a močovém měchýři (Obr. 30).

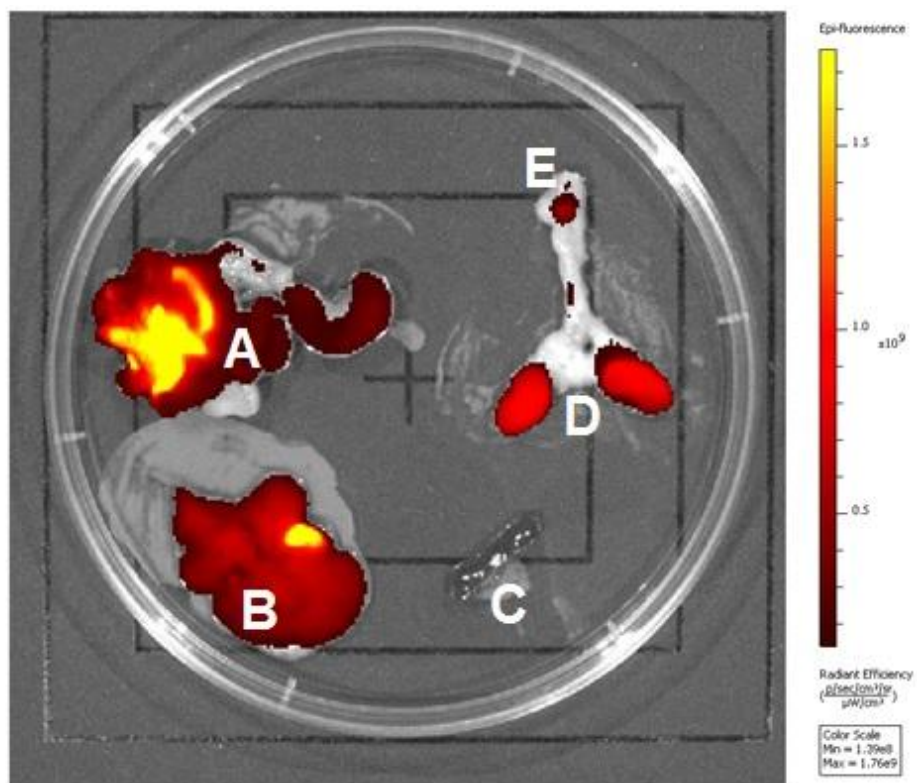


Obrázek 30: Tři polohy zobrazení pro biodistribuci glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 . První myš 30 minut po i.v.aplikacido ocasní žíly.

Fluorescence vnitřních orgánů první myši je na následujících snímcích. Můžeme si povšimnout, že fluorescenční signál je detekovatelný především z jater (Obr. 31 a Obr. 32), případně ledvin (Obr. 32). Fluorescenční signál pocházející ze střev je artefaktem, jedná se o bioluminiscenci tráveniny, což jsme ověřili následnou preparací střeva. Nesvítí slezina (Obr. 32). Malý signál z močového měchýře je způsoben vyprázdněním močového měchýře po usmrcení. Nicméně eliminaci fluorescenční značky nám potvrzuje moč od usmrcené pokusné myši (Obr. 33).



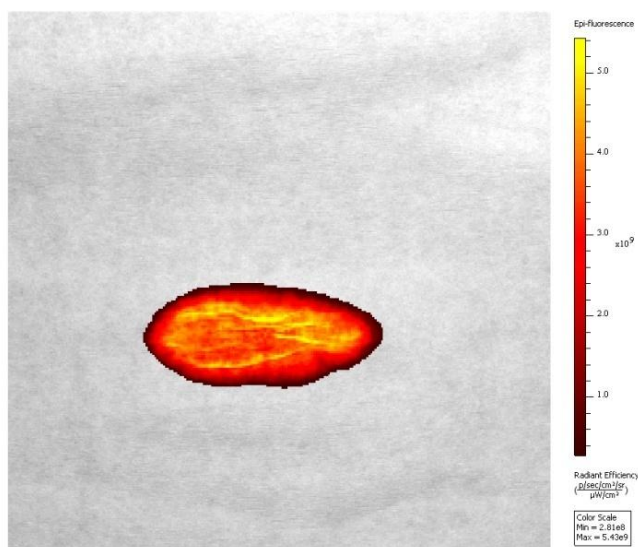
Obrázek 31: Odhalené vnitřní orgány první pokusné myši po ukončení série snímků. Glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 se aplikoval i.v. do ocasní žíly v 9:30, usmrcení zlomením vazů proběhlo ve 14:30.



Obrázek 32: Fluorescence vnitřních orgánů (střevo, játra, ledviny, močový měchýř, slezina).

První pokusná myš usmrcená zlomením vazy pět hodin po i.v. aplikaci glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 do ocasní žíly.

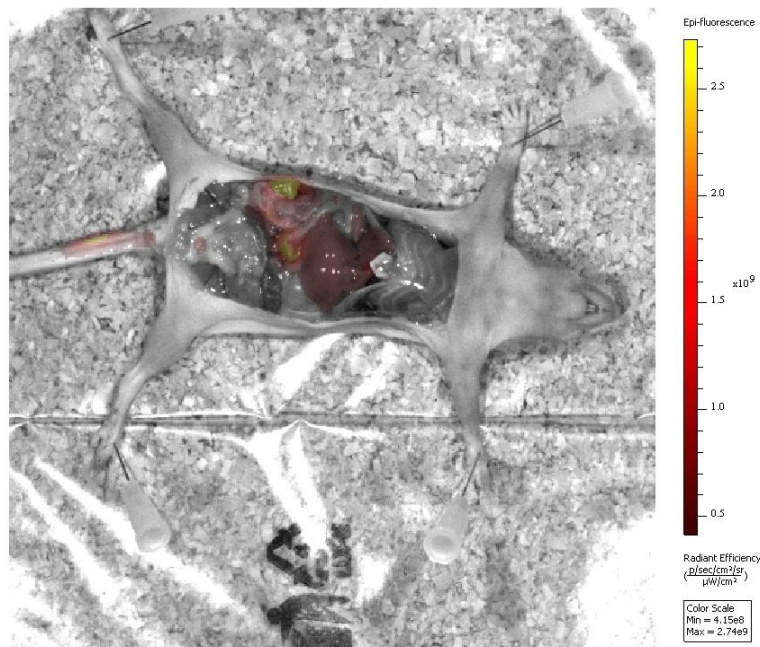
Vysvětlivky: **A** - střevo, **B** - játra, **C** - slezina, **D** - ledviny, **E** -močový měchýř.



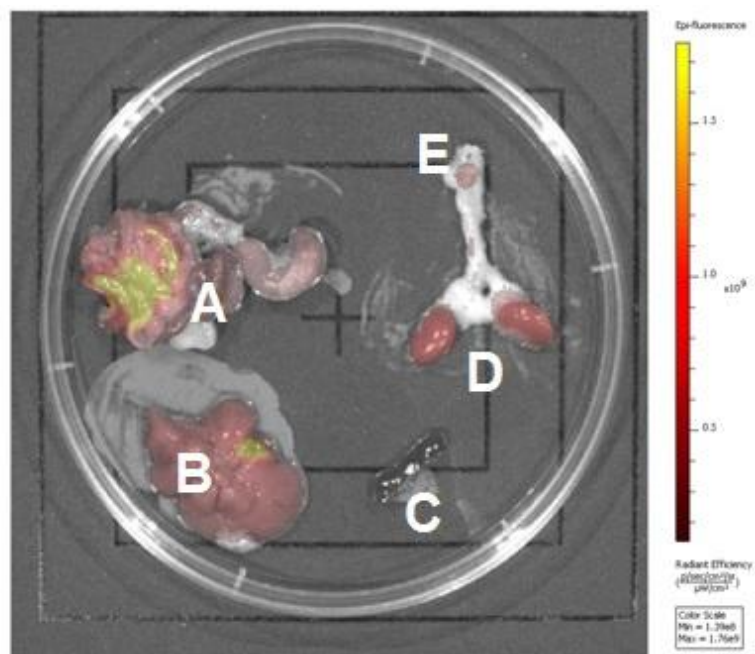
Obrázek 33: Fluorescenční signál moči od první pokusné myši.

Usmrcení a odběr proběhli 5 hodin po i.v. aplikaci glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 do ocasní žíly.

Nastavení fluorescenční škály přístroje neovlivní rozložení fluorescenčního signálu, pouze ho vizuálně oslabí, nicméně proporcčně k původně nastaveným hodnotám (Obr. 34 a Obr. 35).



Obrázek 35: Jinak nastavené fluorescenční škála pro snímek 31.



Obrázek 34: Jinak nastavená fluorescenční škála pro Obr. 32.
Vysvětlivky: **A** - střevo, **B** - játra, **C** - slezina, **D** - ledviny, **E** - močový měchýř.

6. Diskuze

6.1. Průběh vychytávání značeného glykogenu HepG2 buňkami

Zjistili jsme, že všechny testované typy značeného GG jsou vychytávány HepG2 buňkami. HepG2 buňky jsou buňky hepatocelulárního karcinomu, tudíž jsou schopné zpracovávat glykogen (Voma et al. 2014). Z hlediska budoucího využití je důležité, že potenciál degradovat glykogen mají i jiné tkáně díky přítomnosti GP (Newgard et al. 1989). Testovali jsme tři různě chemicky modifikované GG - glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615, glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolin) s nižším obsahem polyoxazolinu a glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolin) s vyšším obsahem polyoxazolinu. U dvou typů glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinu), lišících se obsahem polyoxazolinu, pak byl předpoklad, že vyšší chemická modifikace (= vyšší vazba polyoxazolinu) ovlivní rychlost vychytávání značeného GG z média buňkami, respektive tuto rychlost sníží, viz kapitola 6.1.1.

V případě glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 hodnota fluorescence média od počátku až do ukončení experimentu kontinuálně klesala, což je v souladu i s našimi předchozími výsledky testování tohoto typu značeného glykogenu, které nejsou zařazeny. Buňky tedy glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 vychytávají, nicméně fluorescenční značka v buňce zůstává pravděpodobně díky nekovalentní interakci s vnitrobuněčnými strukturami.

Pokud byly HepG2 buňky inkubovány v médiu s jakýmkoli ze dvou typů glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinu), hodnota fluorescence tohoto média nejprve klesala. Po osmi hodinách začala vzrůstat a posléze se dostala až nad iniciální hodnoty fluorescence. Zdá se tedy, že tento typ značeného GG je intracelulárně degradován a uvolněná fluorescenční značka se exocytózou dostává do zpět do média. Hodnoty fluorescence média se dostávají nad hodnoty iniciální, protože je fluorescenční značka po několika odběrech uvolňována do menšího objemu média. Na původní částici se také jednotlivé molekuly fluorescenčních sond navzájem stíní.

6.1.1. Vliv modifikací značeného glykogenu

Vychytávání nanočástic buňkami je ovlivněno velikostí, tvarem, modifikacemi povrchu a zvláště pak nábojem těchto nanočástic. Nanočástice s pozitivním nábojem na svém povrchu jsou *in vitro* vychytávány rychleji než nanočástice s negativním či neutrálním nábojem, kdy slabě negativní náboj buněčné membrány pomáhá přilnutí nanočástic s pozitivním nábojem a následně i jejich endocytóze (Albanese et al. 2012). Naproti tomu *in vivo* vychytávání nádorem bylo vyšší u nanočástic s neutrálním celkovým nábojem (Arvizo et al. 2011). Vyšší modifikace povrchu nanočástic snižuje rychlost jejich degradace. Příkladem může být sukcinylace dextrinu. Čím vyšší byla míra sukcinylace (vyšší vazba sukcinátu) dextrinu, tím pomaleji byl tento konjugát degradován (Duncan et al. 2008, Hreczuk-Hirst et al. 2001). V případě dvou typů glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinů) jsme náš předpoklad, že vyšší modifikace sníží vychytávání a degradaci HepG2 buněčnou linií vycházející z výše zmíněného, ověřili i pro naše polymerní konjugáty lišící se mírou modifikace.

Pokles hodnoty fluorescence média u glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinu) s vyšším obsahem polyoxazolinu byl méně výrazný než v případě glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinu), který obsahoval méně navázaného polyoxazolinu. Tomuto výsledku odpovídá i nevýrazná změna hodnot fluorescence, kdy se v průběhu experimentu médium značené glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinem) s vyšším obsahem polyoxazolinu vyměnilo za čisté médium. Hodnoty nejprve v podstatě odpovídají hodnotám fluorescence zásobního roztoku média se značeným glykogenem, následně pak bazálními hodnotám fluorescence média, bez výraznějších změn.

6.2. Lokalizace značeného glykogenu v HepG2 buňkách

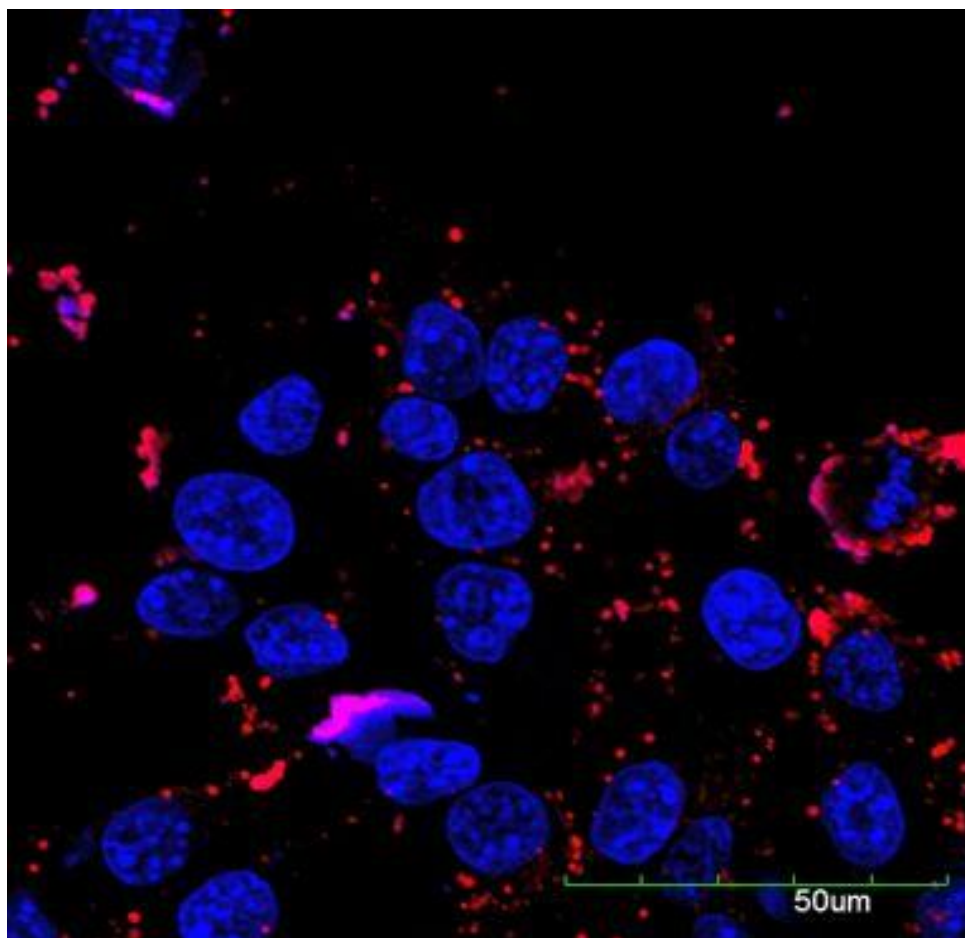
Pomocí několika experimentů s fluorescenčními barvami na různé typy buněčných organel a vždy i se značeným GG (různých typů) jsme dále potvrdili to, co vyplývalo z našich předchozích experimentů s měřením hodnot fluorescence média, tedy vychytávání (endocytózu) značeného GG.

Pokud budeme brát v potaz předpoklad, že GG asociuje se svými enzymy v tzv. glykozómy (Rybicka 1996), měla by jeho intracelulární lokalizace odpovídat lokalizaci těchto enzymů (např. glykogensyntáze) v závislosti na daném buněčném typu. V našem případě, kdy jsme zvolili HepG2 buňky, by měl GG v neaktivní jaterní buňce (bez přidané glukózy) být lokalizovatelný volně v cytoplazmě, nikoliv v jádře ani koncentrován u buněčné stěny (Fernandez-Novell et al. 1997, Garcia-Rocha et al. 2001, Ros et al. 2009). To by bylo v souladu i se všemi našimi výsledky z měření na konfokální mikroskopu a to jak pro glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolin), glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615, tak i pro glykogen-FITC a glykogen-POX-FITC.

U snímku, kde jsou HepG2 buňky značené pouze samotným glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinem) s nižším obsahem polyoxazolinu, můžeme vidět lokalizaci značeného GG volně v cytoplazmě, přičemž si můžeme všimnout výraznějších okrsků, což lze vysvětlit právě onou agregací v glykozómy (Rybicka 1996) či také α -partikule glykogenu (Sullivan et al. 2010).

V případě, kde jsme použili glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 spolu s Hoechst 33342, nám ze zobrazené HepG2 buňky vyplývá, že glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 se v jádru nenachází.

Oba výše zmíněné výsledky jsou ve shodě s pozorováním na 4T1 buňkách (myší buňky nádoru mléčné žlázy), kde byl použit glykogen-DOTA GD-Dyomics 615 spolu s Hoechst 33342, který barví jádra v modrém emisním spektru. Značený GG pak byl lokalizován volně v cytoplazmě těchto buněk (Obr. 36) (Filippov et al. 2012).



Obrázek 36: 4T1 buňky značené glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 spolu s Hoechst 33342 (Filippov et al. 2012).

Dále jsme použili glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 v kombinaci s ER-Tracker™ Blue-White DPX, kde jsme potvrdili předpoklad toho, že značený GG s ER neasociuje.

Poslední snímky, kde jsme kombinovali GG-FITC a GG-POX-FITC s LysoTracker® Deep Red nám naznačují, nicméně ne zcela jednoznačně, že se tento značený GG nejspíše do lysozómů nedostává. V tomto konkrétním případě, zda je či není značený GG lokalizován v lysozómech, bude potřeba ještě dalších experimentů a analýz. V jiném experimentu jsme HepG2 buňky značili pomocí LysoTracker® Blue a glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinu) s nižším obsahem polyoxazolinu. V tomto experimentu fluorescenční barva dansyl (od značeného GG) kolokalizovala s

fluorescenčním signálem LysoTracker® Blue, nicméně to mohlo být dáno i širokým emisním spektrem dansylu a tudíž to mohl být pouhý artefakt.

6.3. Způsob internalizace značeného glykogenu

Receptorem zprostředkovaná endocytóza může být dvou typů, jednak kaveolin dependentní nebo velmi známá klathrinem zprostředkovaná endocytóza. Nicméně endocytóza není jediným způsobem příjmu molekul z extracelulárního prostoru buňkou (Sahay et al. 2008). Pro lepší charakterizaci vlastností našeho značeného GG (způsobu jeho endocytózy) jsme se rozhodli po té, co jsme již úspěšně prokázali, že po přidání značeného GG do média je HepG2 buňkami z tohoto média vychytáván. Následně je lokalizovatelný v cytoplazmě.

Pilotní experiment nepřinesl jednoznačné výsledky ani pro jeden z typů značeného GG (glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 a glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolin) s nižším obsahem polyoxazolinu). Pro glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 jsme nenalezli výrazný rozdíl mezi hodnotou fluorescence média bez inhibitoru, pouze s glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 a hodnotou fluorescence média s glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 a jakýmkoli z inhibitorů (sacharóza, MBCD, cytochalasin D). Což je překvapivé, protože minimálně mezi hodnotou fluorescence média bez inhibitoru, pouze s glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 a hodnotou fluorescence média s glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 a cytochalasinem D by měl být patrný rozdíl, pokud se značený GG dostává do buněk endocytózou, protože cytochalasin D je inhibitorem jak pro kaveolin dependentní endocytózu, tak pro klathrinem zprostředkovanou endocytózu.

U výsledků pro glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolin) s nižším obsahem polyoxazolinu je naznačen vyšší rozdíl mezi hodnotou fluorescence média bez inhibitorů pouze s glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinem) a hodnotou fluorescence média s glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinem) a MBCD, a to ve čtvrté hodině. Dále také mezi hodnotou fluorescence média bez inhibitorů pouze s glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinem) a hodnotou fluorescence média s glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazolinem)

a cytochalasinem D, opět ve čtvrté hodině. To by naznačovalo, že endocytóza tohoto typu značeného GG je zprostředkována kaveolinem. Nicméně pro potvrzení této hypotézy by bylo potřeba delšího časového průběhu měření ve více opakováních, tak aby bylo umožněno statistické hodnocení

Z výše popsaných výsledků se nám nepodařilo přesně určit typ endocytózy značeného GG. Je také možné, že se značený GG do buněk dostává jiným typem cesty.

Závěrem lze říci, že ke zjištění typu endocytózy pro značený GG bude třeba ověření metody, případně kombinace více typů modifikací této metody (měření hodnot fluorescence média v čase, analýza na průtokovém cytometru, analýza fluorescenčním mikroskopu) a více opakování měření.

6.4. Hodnocení cytotoxicity značeného glykogenu

Jako první jsme provedli pilotní testy cytotoxicity značeného GG, konkrétně pak GG-FITC. Náš předpoklad byl, že GG, jakožto organismu známá molekula, bude buňkami dobře snášen. Nicméně jsme nemohli vyloučit vliv chemických modifikací na viabilitu buněk, ani skutečnosti, že námi používaný GG je původem ústříčný a nikoli lidský (HepG2 buňky jsou lidskou nádorovou linií).

Všechny předchozí experimenty (měření hodnot fluorescence média, konfokální mikroskopie aj.) naznačovali, že HepG2 buňkám exogenně podaný značený GG výrazně neškodí, přesto jsme se rozhodli ověřit předpokládanou nízkou až nulovou cytotoxicitu našeho preparátu klasickým testem cytotoxicity za použití MTT.

Výsledky testu odhalili překvapivou, ale ne nečekanou skutečnost. Zjistili jsme, že po podání GG-FITC nejen buňky neztrácely s vyšší koncentrací preparátu svoji viabilitu a schopnost se dále dělit, ale naopak se jejich viabilní počet, byť až na hodnoty viability u nejvyšší koncentrace GG-FITC nesignifikantně, oproti HepG2 buňkám bez vystavení GG-FITC po dobu 24 hodin zvyšoval. Tuto skutečnost vysvětlujeme tím, že HepG2 buňky jsou buňkami hepatocelulárního karcinomu, tudíž odvozené od jaterních buněk, které jsou na zpracování glykogenu dobře zařízené

a přidáním značeného GG jim poskytuje další zdroj energie pro jejich růst, protože značený GG je přírodním polysacharidem.

6.5. Biodistribuce a eliminace Glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 *in vivo* u CD1-Nude myši

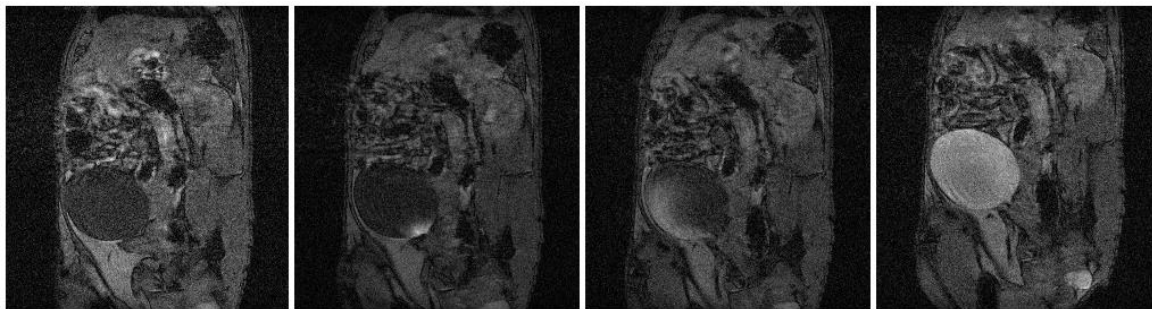
In vivo experiment nám poskytl informace o chování nosiče na bázi glykogenu v celém organismu, konkrétně pak u živé zdravé (nenádorové) myši kmene CD1-Nude. Cílem experimentu byla charakterizace průběhu biodistribuce po i.v. podání značeného glykogenu, ověření toho, zda není značený GG vychytáván retikuloendotelovým systémem (RES) a určení převažujícího způsobu eliminace značeného GG, respektive fluorescenční značky po jejím odštěpení při degradaci GG. Pro tento typ experimentu jsme vybrali glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 kvůli vhodnému emisnímu spektru pro *in vivo* fluorescenční zobrazování.

Z výsledků vyplývá, že glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 je relativně rychle biodistribován krevním řečištěm a následně eliminován, v řádu jednotek hodin.

Z měření fluorescence vnitřních orgánů je také patrné, že značený GG není vychytáván RES, protože vypreparovaná slezina vykazuje nulovou fluorescenci. Je tudíž značně nepravděpodobné, že by se do ní značený GG dostával. Tyto výsledky jsou podpořeny i naším předpokladem. Vychytávání RES lze ovlivnit i velikostí nanočástice (Bamrungsap et al. 2012) nebo modifikací povrchu nanočástice, čímž lze snížit vychytávání nanočástic v RES (Jokerst et al. 2011).

Hlavní cestou eliminace značeného GG, respektive fluorescenční značky po jejím odštěpení při degradaci GG, je moč, která vykazovala vysokou hodnotu změřené fluorescence. Tato skutečnost je plně v souladu i s předchozími výsledky, kde se eliminace glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 testovala pomocí MRI. Pro tento experiment se využívalo Gd jakožto kontrastní látka a nikoliv fluorescenční značka Dyomics 615 (Obr. 37) (Filippov et al. 2012). Tento výsledek nám tak umožňuje konstatovat další dvě důležité skutečnosti. Jednak to, že jsme syntetizovali a zkonstruovali

prokazatelně multimodální zobrazovací nanosystém. Pak také to, že je značený GG štěpen, protože do moči může procházet pouze volná fluorescenční značka. Nikoliv celá molekula GG i se značkou o velikosti $88,8 \pm 0,03$ nm, která touto velikostí přesahuje práh renální filtrace.



Obrázek 37: Průběh vylučování glykogen-DOTA Gd-Dyomics 615 *in vivo* zobrazený pomocí MRI u myši kmene C57/B16 (Filippov et al. 2012).

Dalším z výsledků pokusu *in vivo* je poznatek, že po aplikaci značeného GG s.c. se vytváří po dobu experimentu takřka neměnné depo. Toto takřka neměnné depo lze pozorovat i v oblasti ocasu na všech snímcích první myši, kde se nepodařila první i.v. aplikace do ocasní žíly. Analýza tohoto způsobu aplikace a dynamiky vytvořeného depa bude předmětem dalších studií, nicméně by tento způsob podání mohl představovat slibnou aplikační formu pro depotní nanočásticové přípravky na bázi glykogenu.

7. Závěr

V této práci se nám úspěšně podařilo:

- a) určit průběh vychytávání různě značených glykogenů z média u HepG2 buněk,
- b) potvrdit předpoklad, že vyšší modifikace GG zpomaluje vychytávání,
- c) prokázat akumulaci značeného GG v cytoplazmě po jeho přidání do média,
- d) pomocí MTT testu jako první zjistit, že GG-FITC není cytotoxický, ale naopak se zdá, že růst buněčné kultury HepG2 stimuluje,
- e) určit průběh biodistribuce a hlavní způsob eliminace značeného GG po podání i. v. do ocasní žíly CD1-Nude myši.

Naproti tomu se nám nepodařilo jasně prokázat ani vyvrátit lysozomální lokalizaci a určit způsob vychytávání značeného GG buňkou. Tyto dvě oblasti budou potřebovat více opakování pokusů, další rozvoj a úpravu metodiky.

Další výzkum nosičů na bázi glykogenu bude více zpřesňovat vlastnosti těchto sond a zaměří se na *in vivo* biodistribuci nikoli pouze u nenádorového zvířecího modelu, ale také i u CD1-Nude myši s indukovaným nádorem. Zajímavé jistě bude i dále analyzovat depo, které se vytváří po podání s.c. v oblasti břicha i jinde.

8. Seznam literatury

- Albanese A, Tang PS, Chan WC. 2012. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu Rev Biomed Eng* 14: 1-16.
- Alexiou C, Schmidt A, Klein R, Hulin P, Bergemann C, Arnold W. 2002. Magnetic drug targeting: biodistribution and dependency on magnetic field strength. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 252: 363-366.
- Alexiou C, Jurgons R, Schmid R, Hilpert A, Bergemann C, Parak F, Iro H. 2005. In vitro and in vivo investigations of targeted chemotherapy with magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293: 389-393.
- Arvizo RR, Miranda OR, Moyano DF, Walden CA, Giri K, Bhattacharya R, Robertson JD, Rotello VM, Reid JM, Mukherjee P. 2011. Modulating pharmacokinetics, tumor uptake and biodistribution by engineered nanoparticles. *PLoS One* 6: e24374.
- ATCC. (19/07 2014; http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HB-8065.aspx?geo_country=cz)
- Backer MV, Gaynutdinov TI, Patel V, Bandyopadhyaya AK, Thirumamagal BT, Tjarks W, Barth RF, Claffey K, Backer JM. 2005. Vascular endothelial growth factor selectively targets boronated dendrimers to tumor vasculature. *Mol Cancer Ther* 4: 1423-1429.
- Bai G, Zhang ZJ, Werner R, Nuttall FQ, Tan AW, Lee EY. 1990. The primary structure of rat liver glycogen synthase deduced by cDNA cloning. Absence of phosphorylation sites 1a and 1b. *J Biol Chem* 265: 7843-7848.
- Bamrungsap S, Zhao Z, Chen T, Wang L, Li C, Fu T, Tan W. 2012. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine (Lond)* 7: 1253-1271.
- Bao Y, Dawson TL, Jr., Chen YT. 1996. Human glycogen debranching enzyme gene (AGL): complete structural organization and characterization of the 5' flanking region. *Genomics* 38: 155-165.
- Baque S, Guinovart JJ, Ferrer JC. 1997. Glycogenin, the primer of glycogen synthesis, binds to actin. *FEBS Lett* 417: 355-359.

- Barbetti F, Rocchi M, Bossolasco M, Cordera R, Sbraccia P, Finelli P, Consalez GG. 1996. The human skeletal muscle glycogenin gene: cDNA, tissue expression and chromosomal localization. *Biochem Biophys Res Commun* 220: 72-77.
- Bernard C. 1855. Sur le mécanisme de la formation du sucre dans le foie. *Compte Rendu hebdomadaires de l'Académie des Science*: 461-469.
- . 1857. Sur le mécanisme physiologique de la formation de sucre dans le foie (suite). *Compte Rendu hebdomadaires de l'Académie des Science*: 578-586.
- Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. 2014. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev* 66: 2-25.
- Bollen M, Keppens S, Stalmans W. 1998. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J* 336 (Pt 1): 19-31.
- Cid E, Gomis RR, Geremia RA, Guinovart JJ, Ferrer JC. 2000. Identification of two essential glutamic acid residues in glycogen synthase. *J Biol Chem* 275: 33614-33621.
- Coleman CN, Mitchell JB, Camphausen K. 2002. Tumor hypoxia: chicken, egg, or a piece of the farm? *J Clin Oncol* 20: 610-615.
- Devos P, Hers HG. 1979. A molecular order in the synthesis and degradation of glycogen in the liver. *Eur J Biochem* 99: 161-167.
- Duggleby RG, Chao YC, Huang JG, Peng HL, Chang HY. 1996. Sequence differences between human muscle and liver cDNAs for UDPglucose pyrophosphorylase and kinetic properties of the recombinant enzymes expressed in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 235: 173-179.
- Duncan R, Vicent MJ. 2010. Do HPMA copolymer conjugates have a future as clinically useful nanomedicines? A critical overview of current status and future opportunities. *Advanced drug delivery reviews* 62: 272-282.
- Duncan R, Gilbert HR, Carbajo RJ, Vicent MJ. 2008. Polymer masked-unmasked protein therapy. 1. Bioresponsive dextrin-trypsin and -melanocyte stimulating hormone conjugates designed for alpha-amylase activation. *Biomacromolecules* 9: 1146-1154.

- Edelman RR, Warach S. 1993. Magnetic resonance imaging (1). *N Engl J Med* 328: 708-716.
- Ercan N, Gannon MC, Nuttall FQ. 1994. Incorporation of glycogenin into a hepatic proteoglycogen after oral glucose administration. *J Biol Chem* 269: 22328-22333.
- Fang J, Nakamura H, Maeda H. 2011. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev* 63: 136-151.
- Faraji AH, Wipf P. 2009. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg Med Chem* 17: 2950-2962.
- Fernandez-Novell JM, Bellido D, Vilaro S, Guinovart JJ. 1997. Glucose induces the translocation of glycogen synthase to the cell cortex in rat hepatocytes. *Biochem J* 321 (Pt 1): 227-231.
- Fernandez-Novell JM, Lopez-Iglesias C, Ferrer JC, Guinovart JJ. 2002. Zonal distribution of glycogen synthesis in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett* 531: 222-228.
- Ferrer JC, Baque S, Guinovart JJ. 1997. Muscle glycogen synthase translocates from the cell nucleus to the cytosol in response to glucose. *FEBS Lett* 415: 249-252.
- Filippov SK, et al. 2012. Glycogen as a biodegradable construction nanomaterial for in vivo use. *Macromol Biosci* 12: 1731-1738.
- Folkman J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-1186.
- Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. 1971. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 133: 275-288.
- Frangioni JV. 2003. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol* 7: 626-634.
- Freshney RI. 2000. *Culture of Animal Cells Set: CD-ROM and Culture of Animal Cells*: Wiley.
- Fuhring J, Damerow S, Fedorov R, Schneider J, Munster-Kuhnel AK, Gerardy-Schahn R. 2013. Octamerization is essential for enzymatic function of human UDP-glucose pyrophosphorylase. *Glycobiology* 23: 426-437.

Gao GH, Li Y, Lee DS. 2013. Environmental pH-sensitive polymeric micelles for cancer diagnosis and targeted therapy. *J Control Release* 169: 180-184.

Garcia-Rocha M, Roca A, De La Iglesia N, Baba O, Fernandez-Novell JM, Ferrer JC, Guinovart JJ. 2001. Intracellular distribution of glycogen synthase and glycogen in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem J* 357: 17-24.

Hanashiro I, Roach PJ. 2002. Mutations of muscle glycogen synthase that disable activation by glucose 6-phosphate. *Arch Biochem Biophys* 397: 286-292.

Hockel M, Vaupel P. 2001. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 93: 266-276.

Hreczuk-Hirst D, Chicco D, German L, Duncan R. 2001. Dextrins as potential carriers for drug targeting: tailored rates of dextrin degradation by introduction of pendant groups. *Int J Pharm* 230: 57-66.

Hruby M. 2012. Nano-sized Carrier Systems as New Materials for Nuclear Medicine. Pages 715-739. *Intelligent Nanomaterials*, John Wiley & Sons, Inc.

Hrubý M. 2010. "Chytrá" léčiva na bázi polymerů? *Vesmír*: 711-712.

Hrubý M, Kučka J, Kozempel J, Lebeda O. 2006. Cílené polymerní nosiče léčiv v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy*: 10-16.

Charles River Laboratories International I. (08/07 2014; <http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/cd-1-nude-mouse>)

Chen H, Zhen Z, Todd T, Chu PK, Xie J. 2013. Nanoparticles for Improving Cancer Diagnosis. *Mater Sci Eng R Rep* 74: 35-69.

Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG, Shin DM. 2008. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res* 14: 1310-1316.

Issoglio FM, Carrizo ME, Romero JM, Curtino JA. 2012. Mechanisms of monomeric and dimeric glycogenin autoglucosylation. *J Biol Chem* 287: 1955-1961.

- Izawa H, Nawaji M, Kaneko Y, Kadokawa J. 2009. Preparation of glycogen-based polysaccharide materials by phosphorylase-catalyzed chain elongation of glycogen. *Macromol Biosci* 9: 1098-1104.
- Johnson LN. 1992. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *FASEB J* 6: 2274-2282.
- Johnson LN, Barford D. 1990. Glycogen phosphorylase. The structural basis of the allosteric response and comparison with other allosteric proteins. *J Biol Chem* 265: 2409-2412.
- Jokerst JV, Lobovkina T, Zare RN, Gambhir SS. 2011. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)* 6: 715-728.
- Jun YW, Lee JH, Cheon J. 2008. Chemical design of nanoparticle probes for high-performance magnetic resonance imaging. *Angew Chem Int Ed Engl* 47: 5122-5135.
- Kherlopian AR, Song T, Duan Q, Neimark MA, Po MJ, Gohagan JK, Laine AF. 2008. A review of imaging techniques for systems biology. *BMC Syst Biol* 2: 74.
- Kleczkowski LA, Geisler M, Ciereszko I, Johansson H. 2004. UDP-glucose pyrophosphorylase. An old protein with new tricks. *Plant Physiol* 134: 912-918.
- Kopecek J. 2013. Polymer-drug conjugates: origins, progress to date and future directions. *Adv Drug Deliv Rev* 65: 49-59.
- Kopecek J, Kopeckova P. 2010. HPMA copolymers: origins, early developments, present, and future. *Adv Drug Deliv Rev* 62: 122-149.
- Krisman CR, Barengo R. 1975. A precursor of glycogen biosynthesis: alpha-1,4-glucan-protein. *Eur J Biochem* 52: 117-123.
- Kuil J, Velders AH, van Leeuwen FW. 2010. Multimodal tumor-targeting peptides functionalized with both a radio- and a fluorescent label. *Bioconj Chem* 21: 1709-1719.
- Larson N, Ghandehari H. 2012. Polymeric conjugates for drug delivery. *Chem Mater* 24: 840-853.
- Leamon CP, Low PS. 2001. Folate-mediated targeting: from diagnostics to drug and gene delivery. *Drug Discov Today* 6: 44-51.

- Lee YC, Chang CJ, Bali D, Chen YT, Yan YT. 2011. Glycogen-branching enzyme deficiency leads to abnormal cardiac development: novel insights into glycogen storage disease IV. *Hum Mol Genet* 20: 455-465.
- Li B, Xu H, Li Z, Yao M, Xie M, Shen H, Shen S, Wang X, Jin Y. 2012. Bypassing multidrug resistance in human breast cancer cells with lipid/polymer particle assemblies. *Int J Nanomedicine* 7: 187-197.
- Lloyd JB, Mason RW. 1996. *Biology of the Lysosome*: Springer.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 1999. *Molecular Cell Biology*: W. H. Freeman.
- Lomako J, Lomako WM, Whelan WJ. 1988. A self-glucosylating protein is the primer for rabbit muscle glycogen biosynthesis. *FASEB J* 2: 3097-3103.
- . 2004. Glycogenin: the primer for mammalian and yeast glycogen synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1673: 45-55.
- Louie A. 2010. Multimodality imaging probes: design and challenges. *Chem Rev* 110: 3146-3195.
- Lubbe AS, Alexiou C, Bergemann C. 2001. Clinical applications of magnetic drug targeting. *J Surg Res* 95: 200-206.
- Lucchiari S, Santoro D, Pagliarani S, Comi GP. 2007. Clinical, biochemical and genetic features of glycogen debranching enzyme deficiency. *Acta Myol* 26: 72-74.
- Mahadevan S, Dillard CJ, Tappel AL. 1969. Degradation of polysaccharides, mucopolysaccharides, and glycoproteins by lysosomal glycosidases. *Arch Biochem Biophys* 129: 525-533.
- Matsumura Y, Maeda H. 1986. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 46: 6387-6392.
- Meng M, Fitzek E, Gajowniczek A, Wilczynska M, Kleczkowski LA. 2009. Domain-specific determinants of catalysis/substrate binding and the oligomerization status of barley UDP-glucose pyrophosphorylase. *Biochim Biophys Acta* 1794: 1734-1742.

Menjoge AR, Kannan RM, Tomalia DA. 2010. Dendrimer-based drug and imaging conjugates: design considerations for nanomedical applications. *Drug Discov Today* 15: 171-185.

Min-Ho L, Hyung-Nam S, Ji-Eun C, Lan TP, Sunghoon P, Jong-Tae P, Eui-Jeon W. 2014. Association of bi-functional activity in the N-terminal domain of glycogen debranching enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 445: 107-112.

Moore T, Chen H, Morrison R, Wang F, Anker JN, Alexis F. 2014. Nanotechnologies for noninvasive measurement of drug release. *Mol Pharm* 11: 24-39.

Morava E. 2014. Galactose supplementation in phosphoglucomutase-1 deficiency; review and outlook for a novel treatable CDG. *Mol Genet Metab*.

Mu J, Skurat AV, Roach PJ. 1997. Glycogenin-2, a novel self-glucosylating protein involved in liver glycogen biosynthesis. *J Biol Chem* 272: 27589-27597.

Mura S, Couvreur P. 2012. Nanotheranostics for personalized medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 64: 1394-1416.

Newgard CB, Hwang PK, Fletterick RJ. 1989. The family of glycogen phosphorylases: structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 24: 69-99.

Nuttall FQ, Gannon MC, Bai G, Lee EY. 1994. Primary structure of human liver glycogen synthase deduced by cDNA cloning. *Arch Biochem Biophys* 311: 443-449.

Pautler RG. 2004. Mouse MRI: concepts and applications in physiology. *Physiology (Bethesda)* 19: 168-175.

Petrovsky A, Schellenberger E, Josephson L, Weissleder R, Bogdanov A, Jr. 2003. Near-infrared fluorescent imaging of tumor apoptosis. *Cancer Res* 63: 1936-1942.

Pitcher J, Smythe C, Cohen P. 1988. Glycogenin is the priming glucosyltransferase required for the initiation of glycogen biogenesis in rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 176: 391-395.

- Pitcher J, Smythe C, Campbell DG, Cohen P. 1987. Identification of the 38-kDa subunit of rabbit skeletal muscle glycogen synthase as glycogenin. *Eur J Biochem* 169: 497-502.
- Pospíšilová A. 2014. Multimodální termoresponsivní polymerní nanodiagnostika nádorových onemocnění – analýza chování pomocí fluorescenčních sond a rozptylu světla VYSOKÁ ŠKOLACHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE.
- Rao J, Dragulescu-Andrasi A, Yao H. 2007. Fluorescence imaging in vivo: recent advances. *Curr Opin Biotechnol* 18: 17-25.
- Ray WJ, Jr., Roscelli GA. 1964a. The Phosphoglucomutase Pathway. An Investigation of Phospho-Enzyme Isomerization. *J Biol Chem* 239: 3935-3941.
- . 1964b. A Kinetic Study of the Phosphoglucomutase Pathway. *J Biol Chem* 239: 1228-1236.
- Roach PJ, Cheng C, Huang D, Lin A, Mu J, Skurat AV, Wilson W, Zhai L. 1998. Novel aspects of the regulation of glycogen storage. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 9: 139-151.
- Ros S, Garcia-Rocha M, Dominguez J, Ferrer JC, Guinovart JJ. 2009. Control of liver glycogen synthase activity and intracellular distribution by phosphorylation. *J Biol Chem* 284: 6370-6378.
- Russell-Jones G, McTavish K, McEwan J, Rice J, Nowotnik D. 2004. Vitamin-mediated targeting as a potential mechanism to increase drug uptake by tumours. *J Inorg Biochem* 98: 1625-1633.
- Rybicka KK. 1996. Glycosomes--the organelles of glycogen metabolism. *Tissue Cell* 28: 253-265.
- Sahay G, Batrakova EV, Kabanov AV. 2008. Different internalization pathways of polymeric micelles and unimers and their effects on vesicular transport. *Bioconjug Chem* 19: 2023-2029.
- SKA Polska. (05/08 2014; <http://www.ska-polska.pl/en/projects/stopping-bleeding>)
- Smythe C, Cohen P. 1991. The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *Eur J Biochem* 200: 625-631.

Smythe C, Villar-Palasi C, Cohen P. 1989. Structural and functional studies on rabbit liver glycogenin. *Eur J Biochem* 183: 205-209.

Sullivan MA, Vilaplana F, Cave RA, Stapleton D, Gray-Weale AA, Gilbert RG. 2010. Nature of alpha and beta particles in glycogen using molecular size distributions. *Biomacromolecules* 11: 1094-1100.

Svenson S, Tomalia DA. 2005. Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field. *Adv Drug Deliv Rev* 57: 2106-2129.

Taurin S, Nehoff H, Greish K. 2012. Anticancer nanomedicine and tumor vascular permeability; Where is the missing link? *J Control Release* 164: 265-275.

Taylor C, Cox AJ, Kernohan JC, Cohen P. 1975. Debranching enzyme from rabbit skeletal muscle. Purification, properties and physiological role. *Eur J Biochem* 51: 105-115.

Thon VJ, Khalil M, Cannon JF. 1993. Isolation of human glycogen branching enzyme cDNAs by screening complementation in yeast. *J Biol Chem* 268: 7509-7513.

Tirone TA, Brunicardi FC. 2001. Overview of glucose regulation. *World J Surg* 25: 461-467.

Villar-Palasi C, Guinovart JJ. 1997. The role of glucose 6-phosphate in the control of glycogen synthase. *FASEB J* 11: 544-558.

Voet D, Voetová JG. 1995. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing.

Voma C, Barfell A, Croniger C, Romani A. 2014. Reduced cellular Mg(2)(+) content enhances hexose 6-phosphate dehydrogenase activity and expression in HepG2 and HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys* 548: 11-19.

von Wilamowitz-Moellendorff A, et al. 2013. Glucose-6-phosphate-mediated activation of liver glycogen synthase plays a key role in hepatic glycogen synthesis. *Diabetes* 62: 4070-4082.

9. Přílohy

TERMORESPONZIVNÍ HYBRIDNÍ MATERIÁLY GLYKOGEN-GRAFT-POLY(2-ALKYL-2-OXAZOLIN) PRO BIOMEDICINÁLNÍ POUŽITÍ

Aneta Pospíšilová¹, Martin Hrubý¹, Markéta Jiráťová², Jan Kovář², Petr Štěpánek¹

¹Ústav makromolekulární chemie Akademie věd České republiky, v.v.i., Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6, Česká republika

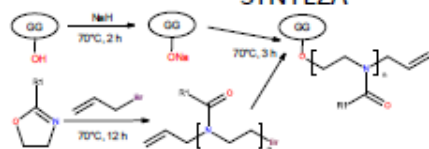
²Institut klinické a experimentální medicíny, Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4, Česká republika

ÚVOD

Poly(2-alkyl-2-oxazolin) jsou skupinou polymerů, kterým je věnována velká pozornost pro jejich biokompatibilitu, možnost přípravy polymerů v širokém rozmezí volitelných vlastností díky rozmanitosti monomerů a možnost celé řady postpolymerizačních modifikací. Glykogen je živočišný zásobní polysacharid typický vysokým stupněm větvení a kulovým tvarem molekuly. Důležitou vlastností pro medicínské využití je velmi pomalá extracelulární biodegradace sérovými amylázami a rychlá degradace intracelulárně.

Spojením glykogenu a termoresponzivních polyoxazolinů získáváme termoresponzivní materiál, který si zachovává částečně hydrofilní charakter i nad kritickou teplotou a umožňuje účinnou adhezi buněk. Jeho stavové chování a rychlost degradace jsou nastavitelné změnou obsahu, složení a molekulovou hmotností polyoxazolinových roubů. Tyto vlastnosti předurčují glykogen-graft-poly(2-alkyl-2-oxazolin) k rozsáhlému využití v tkáňovém inženýrství a jako injekovatelná depa pro cílenou radioterapii a chemoterapii.

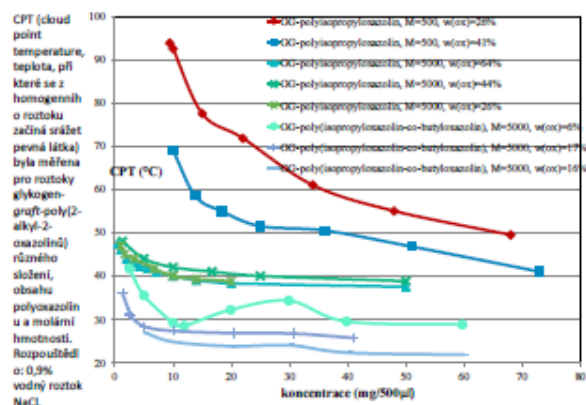
SYNTEZA



Glykogen-graft-poly(2-alkyl-2-oxazolin) byly připraveny kationtovou polymerací 2-alkyl-2-oxazolinu za iniciace silylbromidem a následnou nukleofilní substitucí bromu sodnou solí glykogenu.

CHARAKTERIZACE

Fázové chování z pohledu makroskopického měření CPT

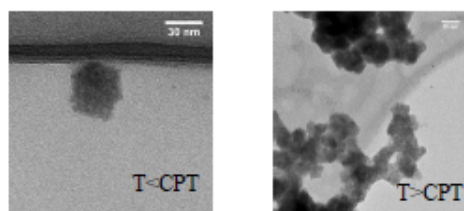


CPT (cloud point temperature) v závislosti na koncentraci. Porovnání různých GG-graft-poly(2-alkyl-2-oxazolinů).

Je patrné, že CPT klesá s:

- rostoucí molární hmotností polyoxazolinového roubu (viz data pro GG-polyisopropyl-oxazolin, M=500 a 5000)
- s hydrofobicitou alkylových skupin (viz data pro GG-polyisopropyl-oxazolin M=5000 a GG-polyisopropyl-oxazolin-co-butyl-oxazolin)
- s rostoucím obsahem polyoxazolinu

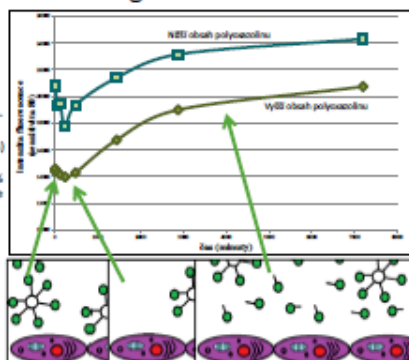
Fázové chování s pohledu mikroskopického CRYO-TEM



Fázové chování glykogen-graft-poly(2-isopropyl-2-oxazolinu) v roztoku - vlevo snímek z transmisního elektronového mikroskopu při teplotě nižší než CPT, vpravo při teplotě vyšší. Kontrast byl zvýšen přidáním octanu uranulu.

Biodegradace

Biodegradovatelnost glykogen-graft-poly(2-alkyl-2-oxazolinů) byla ověřena pokusem s fluorescenčně danými skupinami značeným glykogen-graft-poly(2-methyl-2-oxazolinem) (GG-PMO-DS) K HepG2 buňkám (stálí 32 pasáž) byl přidán 0,6% roztok GG-PMO-DS. Lahve se vzorky byly uloženy v inkubátoru na teplotě pro zajištění rovnoměrného přístupu glykogenu k buňkám. Z roztoků byly postupně odebrány vzorky, měřila se fluorescence v závislosti na době inkubace.



Nahoře: Závislost intenzity fluorescence na čase.

Dole: předpokládaný průběh biodegradace. 1) buňky v roztoku obsahujícím fluorescenčně značený GG-graft-polyoxazolin, 2) koncentrace se snižuje v důsledku příjmu materiálu buňkami 3) fluorescence opět roste díky vylučování fluorescenční značky z buněk

ZÁVĚR

Úspěšně jsme připravili a charakterizovali řadu glykogen-graft-poly(2-alkyl-2-oxazolinů). Při analýze fázového chování v roztoku bylo zjištěno, že největší vliv na teplotu fázového přechodu (CPT) má složení a molekulová hmotnost polyoxazolinu, naopak obsah polymeru fázové chování příliš nemění. Vliv obsahu polymeru je nepřímo úměrný molární hmotnosti polyoxazolinového roubu.

Pokus na HepG2 buňkách potvrdil dobrou biodegradovatelnost, data jsou v souladu s navrženým průběhem odbourávání.

Tyto výsledky potvrzují, že glykogen-graft-poly(2-alkyl-2-oxazolin) jsou slibnými materiály pro biomedicínské využití.

Tato práce vznikla za podpory grantu Akademie věd České republiky č. M200501201, grantu 2012C2006 Akademie věd České republiky – bilaterální spolupráce s Argentinou a grantu Ministerstva průmyslu a obchodu č. TIP FR14/625.